



MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3423105 (13) T2

(51) Int. Cl.:A61K 47/68 (2017.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0061 (22) Data de depozit: 2017.03.02 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17711475.8, 2017.03.02 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3423105, 2019.01.09 (31) Numărul cererii prioritare: 201662302562 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.03.02 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2021, 2021.10.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 18/2021, 2021.05.05 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 02/2019, 2019.02.28
(71) Solicitant: EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD., JP (72) Inventatori: ALBONE Earl F., US; CHENG Xin, US; CUSTAR Daniel W., US; FURUUCHI Keiji, US; LI Jing, US; MAJUMDER Utpal, US; UENAKA Toshimitsu, US (73) Titular: EISAI R&D MANAGEMENT CO. LTD., JP (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Conjuğați anticorp-medicament pe bază de eribulină și metode de utilizare

(57) Rezumat:

1

Sunt dezvăluite toxine de legătură și conjuğați anticorp-medicament care se leagă de ținte antigenice oncologice umane, cum ar fi receptorul alfa al folatului și/sau care oferă activitate medicamentoasă anti-tubulină. Toxinele de legătură și conjuğații anticorp-medicament cuprind o fracțiune medicamentoasă eribulină și pot fi internalizate în celulele care exprimă antigenul țintă.

2

Dezvăluirea se referă, de asemenea, la metode și compoziții pentru utilizare în tratamentul cancerului prin administrarea conjuğaților anticorp-medicament prevăzuți aici.

Secvențe: 368

Revendicări: 13

Figuri: 23

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

(54) Eribulin-based antibody-drug conjugates and methods of use**(57) Abstract:**

1

Linker toxins and antibody-drug conjugates that bind to human oncology antigen targets such as folate receptor alpha and/or provide anti-tubulin drug activity are disclosed. The linker toxins and antibody-drug conjugates comprise an eribulin drug moiety and can be internalized into target antigen-

2

expressing cells. The disclosure further relates to methods and compositions for use in the treatment of cancer by administering the antibody-drug conjugates provided herein.

Sequences: 368

Claims: 13

Fig.: 23

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENȚIEI**

Prezenta descriere a invenției se referă la conjugați anticorp medicament (ADC-uri) care leagă țintele antigenului oncologic uman cum ar fi receptorul alfa al folatului și/sau asigură activitate medicamentoasă anti-tubulină. Descrierea invenției se referă suplimentar la metode și compoziții utile în tratamentul și diagnosticarea cancerelor care exprimă receptorul alfa al folatului și/sau sunt capabile să fie influențate de tratament prin perturbarea tubulinei.

STADIUL TEHNICII

Cancerul se numără printre principalele cauze de morbiditate și mortalitate la nivel mondial, cu aproximativ 14 milioane de cazuri noi și 8,2 milioane de decese cauzate de cancer în 2012. Cele mai frecvente cauze de deces de cancer sunt cancerul de plămân (1,59 milioane de decese); ficat (745.000 de decese); stomac (723.000 de decese); colorectal (694.000 de decese); sân (521.000 de decese); și esofag (400.000 de decese). Se preconizează că numărul de noi cazuri de cancer va crește cu aproximativ 70% în următoarele două decenii, la aproximativ 22 de milioane de cazuri noi de cancer pe an (World Cancer Report 2014).

Microtubulii sunt proteine cito-scheletice filamentoase dinamice care sunt implicate într-o varietate de funcții celulare, inclusiv migrație intracelulară și transport, semnalizare celulară și menținerea formei celulare. Microtubulii joacă, de asemenea, un rol critic în diviziunea celulelor mitotice prin formarea fusului mitotic necesar pentru a separa cromozomii în două celule fiice. Funcțiile biologice ale microtubulilor în toate celulele sunt reglate în mare parte de dinamica lor de polimerizare, care are loc prin adăugarea reversibilă, non-covalentă, a dimerilor de tubulină α și β la ambele capete ale microtubulilor. Acest comportament dinamic și controlul rezultat asupra lungimii microtubulilor sunt vitale pentru funcționarea corectă a fusului mitotic. Alterarea chiar minoră a dinamicii microtubulilor poate angaja punctul de control al fusului, poate opri progresia ciclului celular la mitoză, și, ulterior, poate duce la moartea celulară (Mukhtar și colab., (2014) Mol. Cancer Ther., 13: 275-84). Datorită diviziunii celulare rapide a acestora, celulele canceroase sunt în general mai sensibile la compușii care se leagă la tubulină și îi perturbă funcția normală, în comparație cu celulele normale. Din acest motiv, inhibitorii tubulinei și alți agenți țintiți de microtubuli au devenit o clasă promițătoare de medicamente pentru tratamentul cancerului (Dumontet și Jordan, (2010) Nat. Rev. Drug Discov., 9: 790 - 803).

Receptorul alfa al folatului (FRA) este o proteină de membrană legată de glicofosfatidilinozitol (GPI) care leagă folatul. În timp ce rolul FRA în biologia țesutului normal și canceroasă nu este pe deplin înțeles, este extrem de supra-exprimit într-un procent ridicat de cancer ovarien de origine epitelială (O'Shannessy și colab., (2013) Int. J. Gynecol. Pathol., 32 (3): 258-68), precum și într-un procent de carcinoame pulmonare cu celule non-mici (Christoph și colab., (2014) Clin. Lung Cancer, 15 (5): 320-30). FRA are, de asemenea, o exprimare limitată în țesuturile normale. Aceste proprietăți fac din FRA o țintă atractivă pentru imunoterapia cancerului.

Diamantis și colab., (2016) Brit. J. Cancer, 114: 362 - 367, face cunoscută o trecere în revistă a conjugaților anticorp-medicament, inclusiv conjugații antiFRA-anticorp.

EXPUNEREA INVENȚIEI

Intr-un prim aspect, prezenta invenție furnizează un conjugat anticorp-medicament cu Formula (I):



în care (i) Ab este un anticorp anti-receptorul alfa al folatului de internalizare sau fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 2 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 3 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 4 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 7 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 8 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 9 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 13 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 14 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 15 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 16 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 17 (LCDR2), și ID. SECV. NR.:

18 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT; (ii) D este eribulină; (iii) L este un linker care poate fi scindat care cuprinde Mal-(PEG)2-Val-Cit-pAB; și (iv) *p* este un număr întreg de la 1 până la 8. Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen poate cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 23, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 24. *p* poate fi un număr întreg de la 3 la 4. Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen poate cuprinde un domeniu constant al lanțului greu al IgG1 umane și un domeniu constant al lanțului ușor kappa al Ig umane.

Intr-un al doilea aspect, prezenta invenție furnizează o compoziție care cuprinde mai multe copii ale conjugatului anticorp-medicament din primul aspect, în care *p* mediu al conjugatelor anticorp-medicament în compoziție este de la aproximativ 3,2 până la aproximativ 3,8 sau de la aproximativ 3,6 până la aproximativ 4,4.

Intr-un al treilea aspect, prezenta invenție asigură că primul aspect sau al doilea aspect pot fi pentru utilizare în tratamentul unui cancer care exprimă receptorul alfa al folatului. Cancerul este un cancer gastric, un cancer ovarian seros, un cancer ovarian cu celule clare, un cancer pulmonar cu celule non-mici, un cancer colorectal, un cancer mamar triplu negativ, un cancer endometrial, un cancer endometrial seros, un carcinoid pulmonar, sau un osteosarcom.

Intr-un al patrulea aspect, prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică ce cuprinde conjugatul anticorp-medicament din primul aspect sau compoziția din cel de-al doilea aspect, și un transportor acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

Intr-un al cincilea aspect, prezenta invenție furnizează o metodă pentru producerea conjugatului anticorp-medicament din primul aspect sau compoziției din cel de-al doilea aspect, care cuprinde punerea în reacție a unui anticorp sau a unui fragment de legare la antigen cu un linker care poate fi scindat legat la eribulină în condiții care permit conjugare.

Intr-un al șaselea aspect, prezenta invenție furnizează o metodă pentru a determina dacă un pacient va răspunde la tratamentul cu conjugatul anticorp-medicament dintre oricare dintre cele din primul aspect sau compoziția din cel de-al doilea aspect, cuprinzând furnizarea unei probe biologice de la pacient și punerea în contact a probei biologice cu conjugatul anticorp-medicament conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4 sau compoziția conform revendicării 5. Proba biologică poate fi o biopsie tumorală de la un gastric cancer, un cancer ovarian seros, un cancer ovarian cu celule clare, un cancer pulmonar cu celule non-mici, un cancer colorectal, un cancer mamar triplu negativ, un cancer endometrial, un cancer endometrial seros, un carcinoid pulmonar, sau un osteosarcom.

Intr-un al șaptelea aspect, prezenta invenție furnizează o compoziție care cuprinde mai multe copii ale unui conjugat anticorp-medicament of Formula (I):

Ab-(L-D)*p*

(I)

în care (i) Ab este un anticorp anti-receptorul alfa al folatului de internalizare sau fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 2 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 3 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 4 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 7 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 8 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 9 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 13 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 14 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 15 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 16 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 17 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 18 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT; (ii) D este eribulină; (iii) L este un linker care poate fi scindat care cuprinde Mal-(PEG)2-Val-Cit-pAB; și (iv) *p* este numărul mediu de porțiuni indivizibile -L-D per Ab, unde *p* mediu al conjugatelor anticorp-medicament în compoziție este de la aproximativ 3,6 până la aproximativ 4,4. Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen poate cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 23, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 24.

Prezenta descriere a invenției descrie, în parte, compuși noi cu activitate biologică împotriva celulelor tumorale. Compușii pot inhiba creșterea tumorii la mamifere, și pot fi utili pentru tratarea pacienților umani cu cancer.

Prezenta descriere a invenției se referă în mod mai specific la compuși conjugăți anticorp-medicament care sunt capabili să lege, să internalizeze, și să omoare celulele tumorale (de

exemplu, celulele tumorale care exprimă FRA). Sunt făcuți cunoscuți compuși conjugați anticorp-medicament care cuprind un linker care atașează o porțiune indivizibilă de medicament la o porțiune indivizibilă de anticorp. Compușii conjugați anticorp-medicament (ADC) pot fi reprezentați prin Formula I:

5



în care Ab este un anticorp de internalizare sau un fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care țineste o celulă tumorală;

10 D este eribulină;

L este un linker care poate fi scindat care atașează covalent Ab la D; și

p este un număr întreg de la 1 până la 20.

15 Așa cum se descrie în acest document, linkerul este stabil în afara unei celule, astfel încât ADC rămâne intact atunci când este prezent în condiții extracelulare, dar este capabil de a fi scindat la internalizarea într-o celulă, de exemplu, o celulă canceroasă. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de medicament de eribulină este scindată din porțiunea indivizibilă de anticorp atunci când ADC-ul intră într-o celulă care exprimă un antigen specific pentru porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului, iar scindarea eliberează o formă nemodificată de eribulină. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde o porțiune
20 indivizibilă care poate fi scindată care este poziționată astfel încât nicio parte a linkerului sau a porțiunii indivizibile de anticorp nu rămâne legată la porțiunea indivizibilă de medicament de eribulină la scindare.

Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker este o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest
25 document, un ADC care cuprinde o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată demonstrează niveluri de agregare mai mici, raport anticorp:medicament îmbunătățit, ucidere la țintă a celulelor canceroase crescută, ucidere scăzută departe de țintă a celulelor non-canceroase, și/sau o încărcare mai mare a medicamentului (p) în raport cu un ADC care cuprinde o porțiune indivizibilă care poate fi scindată alternativă. Așa cum se descrie în acest document, adăugarea
30 unei porțiuni indivizibile care poate fi scindată crește citotoxicitatea și/sau potența în raport cu un linker non-scindabil. Așa cum se descrie în acest document, potența și/sau citotoxicitatea crescută este într-un cancer care exprimă niveluri moderate ale antigenului țintit de porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului (de exemplu, exprimare moderată a FRA). Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată este scindabilă de o enzimă, iar
35 linkerul este un linker care poate fi scindat de enzimă. Așa cum se descrie în acest document, enzima este cathepsina, iar linkerul este un linker care poate fi scindat de cathepsină. Așa cum se descrie în acest document, linkerul care poate fi scindat de enzimă (de exemplu, linkerul care poate fi scindat de cathepsină) prezintă una sau mai multe dintre proprietățile îmbunătățite menționate mai sus, în comparație cu un mecanism de scindare alternativ.

40 Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată în linker cuprinde o unitate de aminoacizi. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi cuprinde valină-citrulină (Val-Cit). Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde Val-Cit demonstrează stabilitate crescută, ucidere scăzută a celulelor departe de țintă, ucidere a celulelor la țintă crescută, niveluri de agregare mai mici, și/sau o încărcare mai
45 mare a medicamentului în raport cu un ADC care cuprinde o unitate de aminoacizi alternativă sau o porțiune indivizibilă care poate fi scindată alternativă.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde cel puțin o unitate de distanțiere care unește porțiunea indivizibilă de anticorp la porțiunea indivizibilă care poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere în linker poate cuprinde cel puțin o
50 porțiune indivizibilă de polietilen glicol (PEG). Porțiunea indivizibilă de PEG poate să cuprindă, pentru exemplificare, $-(\text{PEG})_m-$, în care m este un număr întreg de la 1 până la 10. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere în linker cuprinde $(\text{PEG})_2$. Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde o unitate de distanțiere mai scurtă (de exemplu, $(\text{PEG})_2$) demonstrează niveluri de agregare mai mici și/sau o încărcare mai mare a medicamentului în
55 raport cu un ADC care cuprinde o unitate de distanțiere mai lungă (de exemplu, $(\text{PEG})_8$) în ciuda lungimii mai mici a linkerului.

Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere în linker se atașează la porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului prin intermediul unei porțiuni indivizibile de maleimidă (Mal). Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker atașat la
60 porțiunea indivizibilă de anticorp prin intermediul unei Mal demonstrează o încărcare de medicament mai mare în raport cu un ADC care cuprinde un linker atașat la porțiunea indivizibilă

de anticorp prin intermediul unei porțiuni indivizibile alternative. Așa cum se descrie în acest document, Mal în linker este reactivă cu un reziduu de cisteină în porțiunea indivizibilă de anticorp. Așa cum se descrie în acest document, Mal în linker este unită la porțiunea indivizibilă de anticorp prin intermediul unui reziduu de cisteină. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal cuprinde o porțiune indivizibilă de PEG. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)_m, de exemplu, Mal-(PEG)₂. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal atașează porțiunea indivizibilă de anticorp la porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker este o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată, de exemplu, o unitate de aminoacizi. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit.

Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker este unită în mod direct la porțiunea indivizibilă de medicament de eribulină a ADC-ului, iar porțiunea indivizibilă care poate fi scindată este fie conectată în mod direct la porțiunea indivizibilă de anticorp, fie conectată printr-o unitate de distanțiere. Așa cum se descrie în acest document, o unitate de distanțiere atașează, de asemenea, porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker la porțiunea indivizibilă de medicament de eribulină. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere care atașează porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker la porțiunea porțiune indivizibilă de medicament de eribulină este auto-distrugătoare. Așa cum se descrie în acest document, distanțierul auto-distrugător este capabil să elibereze eribulină nemodificată într-o celulă țintă. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere auto-distrugătoare cuprinde un alcool p-aminobenzilic. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere auto-distrugătoare cuprinde p-aminobenziloxycarbonil (pAB). pAB-ul în linker, așa cum se descrie în acest document, atașează porțiunea indivizibilă care poate fi scindată la porțiunea indivizibilă de medicament de eribulină. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă care poate fi scindată este o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată, de exemplu, o unitate de aminoacizi. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Val-Cit-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Val-Cit-pAB și o unitate de distanțiere PEG care unește linkerul la porțiunea indivizibilă de anticorp printr-o Mal.

Așa cum se descrie în acest document, p este un număr întreg de la 1 până la 6, de la 2 până la 5, sau, preferabil, de la 3 la 4. Așa cum se descrie în acest document, p este 4. Așa cum se descrie în acest document, este furnizată o reuniune de ADC-uri, iar p mediu în reuniune este de aproximativ 4 (de exemplu, 3,5 - 4,5, cum ar fi aproximativ 3,8). Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB și p este 4. Așa cum se descrie în acest document, este furnizată o reuniune de ADC-uri, în care fiecare ADC cuprinde un linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB, iar p mediu în reuniune este de aproximativ 4 (de exemplu, 3,5 - 4,5, cum ar fi aproximativ 3,8).

Așa cum se descrie în acest document, anticorpul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare (Ab sau porțiunea indivizibilă de Ab) a ADC-ului este un anticorp sau fragment de anticorp de internalizare anti-receptorul alfa al folatului (FRA), și poate lega celule tumorale care exprimă FRA (adică, ADC-ul țintește celule care exprimă FRA). Așa cum se descrie în acest document, ADC-ul care cuprinde o porțiune indivizibilă de Ab anti-FRA și o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată demonstrează niveluri de agregare mai mici, raport anticorp:medicament îmbunătățit, ucidere la țintă a celulelor canceroase crescută, ucidere scăzută departe de țintă a celulelor non-canceroase, încărcare mai mare a medicamentului (p), citotoxicitate crescută, și/sau potență în raport cu un linker non-scindabil sau un mecanism de scindare alternativ. Așa cum se descrie în acest document, potența și/sau citotoxicitatea crescută este într-un cancer care exprimă niveluri moderate ale antigenului țintit de porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului (de exemplu, exprimare moderată a FRA). Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată este scindabilă de o enzimă, iar linkerul este un linker care poate fi scindat de enzimă. Așa cum se descrie în acest document, enzima este catepsina, iar linkerul este un linker care poate fi scindat de catepsină. Așa cum se descrie în acest document, linkerul care poate fi scindat de enzimă (de exemplu, linkerul care poate fi scindat de catepsină) prezintă una sau mai multe dintre proprietățile îmbunătățite menționate mai sus, în comparație cu un mecanism de scindare alternativ. Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un Mal-(PEG)_m-Val-Cit-pAB.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare se leagă la receptorul alfa al folatului (FRA) și țintește celule tumorale care exprimă FRA. Așa cum se descrie în acest document, anticorpul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde trei regiuni de determinare a

complementarității (CDR-uri) ale lanțului greu și trei CDR-uri ale lanțului ușor, în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 2, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 3, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 4; și cele trei CDR-uri ale lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 7, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 8, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 9, așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 13, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 14, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 15; și CDR-urile lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 16, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 17, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 18, așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde secvențe de cadru umane. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 23 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 24. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare concurează pentru legare și/sau se leagă la același epitop ca un anticorp care cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 23 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 24. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare se leagă la un epitop care cuprinde alanină-histidină-lizină-acid aspartic (AHKD) (ID. SECV. NR.: 365) (O'Shannessy și colab., (2011) Oncotarget 2: 1227-43). Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare se leagă la un epitop care cuprinde NTSQEAHKDVSYL (ID. SECV. NR.: 366).

Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare este un anticorp anti-FRA de internalizare sau fragment de legare la antigen de internalizare. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde trei CDR-uri ale lanțului greu și trei CDR-uri ale lanțului ușor, în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 2, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 3, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 4; și cele trei CDR-uri ale lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 7, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 8, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 9, așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 13, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 14, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 15; și CDR-urile lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 16, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 17, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 18, așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT; linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; și *p* este 4. Așa cum se descrie în acest document, este furnizată o reuniune de astfel de ADC-uri și *p* este de aproximativ 4 (de exemplu, aproximativ 3,8). Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 23 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 24. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare concurează pentru legare și/sau se leagă la același epitop ca un anticorp care cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 23 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 24. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare se leagă la un epitop care cuprinde ID. SECV. NR.: 365. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare se leagă la un epitop care cuprinde ID. SECV. NR.: 366.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare se leagă de receptorul factorului de creștere epidermic uman 2 (her2) și ținteste celule tumorale care exprimă her2. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității (CDR-uri) ale lanțului greu și trei CDR-uri ale lanțului ușor, în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 71,

CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 72, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 73; și cele trei CDR-uri ale lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 74, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 75, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 76, așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 191, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 192, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 193; și CDR-urile lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 194, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 195, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 196, așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde secvențe de cadru umane. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 27 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 28. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare concurează pentru legare și/sau se leagă la același epitop ca un anticorp care cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 27 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 28.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare este un anticorp anti-her2 de internalizare sau fragment de legare la antigen de internalizare. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde trei CDR-uri ale lanțului greu și trei CDR-uri ale lanțului ușor, în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 71, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 72, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 73; și cele trei CDR-uri ale lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 74, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 75, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 76, așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 191, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 192, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 193; și CDR-urile lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 194, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 195, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 196, așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT; linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; și p este 4. Așa cum se descrie în acest document, este furnizată o reuniune de astfel de ADC-uri și p este de aproximativ 4 (de exemplu, aproximativ 3,8). Așa cum se descrie în acest document, anticorpus de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 27 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 28. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare concurează pentru legare și/sau se leagă la același epitop ca un anticorp care cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 27 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 28.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare se leagă de mezotelină (MSLN) și țintește celule tumorale care exprimă MSLN. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității (CDR-uri) ale lanțului greu și trei CDR-uri ale lanțului ușor, în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 65, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 66, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 67; și cele trei CDR-uri ale lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 68, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 69, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 70, așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 185, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 186, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 187; și CDR-urile lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 188, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 189, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 190, așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT. Așa cum se descrie în

acest document, anticorpl de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 25 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 26. Așa cum se descrie în acest document, anticorpl de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig. Așa cum se descrie în acest document, anticorpl de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare concurează pentru legare și/sau se leagă la același epitop ca un anticorp care cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 25 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 26.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpl de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare este un anticorp anti-MSLN de internalizare sau fragment de legare la antigen de internalizare. Așa cum se descrie în acest document, anticorpl de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde trei CDR-uri ale lanțului greu și trei CDR-uri ale lanțului ușor, în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 65, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 66, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 67; și cele trei CDR-uri ale lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 68, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 69, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 70, așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau în care CDR-urile lanțului greu cuprind CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 185, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 186, și CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 187; și CDR-urile lanțului ușor cuprind CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 188, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 189, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 190, așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT; linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; și p este 4. Așa cum se descrie în acest document, este furnizată o reuniune de astfel de ADC-uri și p este de aproximativ 4 (de exemplu, aproximativ 3,8). Așa cum se descrie în acest document, anticorpl de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 25 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 26. Așa cum se descrie în acest document, anticorpl de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig. Așa cum se descrie în acest document, anticorpl de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare concurează pentru legare și/sau se leagă la același epitop ca un anticorp care cuprinde un domeniu variabil al lanțului greu având ID. SECV. NR.: 25 și un domeniu variabil al lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 26.

De asemenea, în acest document sunt descrise compoziții care cuprind mai multe copii ale oricăruia dintre ADC-urile descrise, în care încărcarea medie a medicamentului (p medie) a ADC-urilor în compoziție este cuprinsă între aproximativ 3 și 4, sau aproximativ 3,5 până la aproximativ 4,5, sau aproximativ 4. Așa cum se descrie în acest document, p medie este cuprinsă între aproximativ 3,2 și 3,8. Așa cum se descrie în acest document, p medie este cuprinsă între aproximativ 3,6 și 4,4.

De asemenea, în acest document sunt descrise compoziții care cuprind -L-D, în care D este eribulină; și L este un linker care poate fi scindat care se atașează covalent la D. Așa cum se descrie în acest document, linkerul care poate fi scindat se atașează covalent la amina C-35 pe eribulină. Așa cum se descrie în acest document, linkerul care poate fi scindat cuprinde Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul care poate fi scindat cuprinde o unitate de distanțiere de PEG. Așa cum se descrie în acest document, linkerul care poate fi scindat cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB.

În acest document sunt descrise suplimentar compoziții farmaceutice care cuprind un ADC și un diluant, transportor și/sau excipient acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

Un alt aspect al prezentei descrieri a invenției include utilizări terapeutice și de diagnostic pentru compușii ADC și compozițiile descrise, de exemplu, în tratarea cancerului. Un alt aspect include metode pentru tratarea unui cancer care exprimă un antigen țintit de porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului, cum ar fi FRA. Așa cum se descrie în acest document, sunt descrise metode pentru uciderea sau inhibarea proliferării celulelor tumorale sau a celulelor canceroase prin administrarea unei cantități eficiente din punct de vedere terapeutic și/sau unui regim din oricare dintre ADC-urile descrise. Un alt aspect include metode pentru detectarea celulelor tumorale sau a celulelor canceroase care exprimă FRA utilizând ADC-urile făcute cunoscute, și metode de screening pentru pacienții cu cancer care vor răspunde la tratamentul cu ADC-urile descrise. Așa cum se descrie în acest document, cancerul este un cancer gastric, un cancer ovarian seros, un cancer ovarian cu celule clare, un cancer pulmonar cu celule non-mici, un cancer colorectal, un

cancer mamar triplu negativ, un cancer endometrial, un cancer endometrial seros, un carcinoid pulmonar, sau un osteosarcom. Sunt făcute cunoscute, de asemenea, metode pentru producerea ADC-urilor descrise.

5 SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1 arată una dintre metodologiile utilizate pentru prepararea ADC-urilor MORAb-003. În această abordare, cisteinele neîmperecheate sunt generate prin reducere parțială cu echivalenți molari limitați ai agentului de reducere non-tiol TCEP. Această abordare reduce preferențial legăturile de disulfură intercatenare care leagă lanțul ușor și lanțul greu (o pereche per împerechere H-L) și cele două lanțuri grele în regiunea balama (două perechi per împerechere H-H în cazul IgG1 umane), în timp ce lasă legăturile de disulfură intracatenare intacte.

Figura 2 arată o metodă de sintetizare de maleimidă-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-eribulină (mal-(PEG)₂-VCP-eribulină).

Figura 3 arată o analiză SDS-PAGE a condițiilor de reducere pentru MORAb-003. Benzile sunt indicate în dreapta figurii. Banda M corespunde standardului proteic; banda 1 corespunde MORAb-003 netratat; banda 2 corespunde cu 5,3 mg/ml redus în 70,6 μM TCEP; banda 3 corespunde MORAb-003 5,3 mg/mL redus în 141,2 μM TCEP; banda 4 corespunde MORAb-003 1,5 mg/mL redus în 20 μM TCEP; iar banda 5 corespunde MORAb-003 1,5 mg/mL redus în 40 μM TCEP. Identitățile fiecărei benzi sunt indicate pe gelul din dreapta jos. "H" indică lanț greu. "L" indică lanț ușor.

Figura 4 arată o analiză SDS-PAGE a condițiilor de reducere pentru MORAb-003. Banda 1 corespunde standardului proteic; banda 2 corespunde MORAb-003 netratat; banda 3 corespunde MORAb-003 tratat la un raport MORAb-003:TCEP de 1:1; banda 4 corespunde MORAb-003 tratat la un raport MORAb-003:TCEP de 1:2; banda 5 corespunde MORAb-003 tratat la un raport MORAb-003:TCEP de 1:3; și banda 6 corespunde MORAb-003 tratat la un raport MORAb-003:TCEP de 1:4.

Figura 5 arată o analiză SDS-PAGE non-reducătoare a ADC-urilor MORAb-003 selectate, inclusiv M-MMAE (banda 2), M-DM1 (banda 3), M-0026 (banda 4), M-0260 (banda 5), M-0267 (banda 6), M-0272 (banda 7), M-0285 (banda 8), M-0292 (banda 9), M-027-0381 (banda 10), și M-0284 (banda 11).

Figura 6A arată rezultatele unei analize de citotoxicitate a vecinătăților pentru MORAb-003-maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB-eribulină (M3-VCP-eribulină, sau "MORAb-202"). Figura 6B arată rezultatele unei analize de citotoxicitate a vecinătăților pentru MORAb-003-maleimido-(CH₂)₅-Val-Cit-pAB-ER-001150828 (M3-ER-61318). Figura 6C arată rezultatele unei analize de citotoxicitate a vecinătăților pentru MORAb-003-PEG-pAB-duostatină 3 (M3-027-0285). Informația arătată în legendele figurii respective oferă linia celulară:agent testat (linia celulară/liniile celulare cultivate, densitatea de însămânțare a primei/cele de-a doua linii celulare).

Figurile 7A și 7B arată distribuția raportului medicament-anticorp (DAR) pentru ADC-urile MORAb-003-VCP-eribulină (Figura 7A) și MORAb-003-0285 (Figura 7B) în raport cu MORAb-003 neconjugat. Numerele de deasupra fiecărui vârf indică DAR-ul speciilor individuale.

Figura 8 arată rezultatele unei analize de citotoxicitate - concurența MORAb-003-VCP-eribulină cu MORAb-003 neconjugat (2 μM) în celule IGROV1 sau SJSA-1.

Figura 9 arată cinetica greutatei corporale pentru fiecare grup de șoareci CD-1 (media grupului și SEM) tratați cu o singură doză intravenoasă de vehicul (PBS), sau MORAb-202 la 10, 20, 40, sau 80 mg/kg.

Figura 10 arată cinetica greutatei corporale pentru fiecare grup de șoareci CD-1 (media grupului și SEM) tratați intravenos cu PBS, sau cu eribulină la 0,4, 0,8, 1,6 sau 3,2 mg/kg, în conformitate cu un regim de doze q4dx3 (doze administrate o dată la fiecare patru zile pentru 3 doze în total).

Figura 11 arată cinetica creșterii tumorii pentru fiecare grup de șoareci CB17-SCID implantați cu celule de hNSCLC NCI-H2110 (media grupului și SEM) și tratați cu o singură doză intravenoasă de PBS, MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 1, 2,5, sau 5 mg/kg, sau MORAb-003-0285 la 5 mg/kg.

Figura 12 arată volumele tumorale ale șoarecilor CB17-SCID individuali implantați cu celule de hNSCLC NCI-H2110, precum și media grupului și SEM, în ziua 17. Grupurile au fost tratate cu o singură doză intravenoasă de PBS, MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 1, 2,5, sau 5 mg/kg, sau MORAb-003-0285 la 5 mg/kg.

Figura 13 arată cinetica greutatei corporale pentru fiecare grup de șoareci CB17-SCID implantați cu NCI-H2110 (media grupului și SEM) tratați cu o singură doză intravenoasă de PBS, MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 1, 2,5, sau 5 mg/kg, sau MORAb-003-0285 la 5 mg/kg.

Figura 14 arată cinetica creșterii tumorii pentru fiecare grup de șoareci CB17-SCID implantați cu NCI-H2110 (media grupului și SEM) tratați intravenos cu vehicul (PBS), sau cu eribulină la 0,5, 0,2, 0,8, sau 1,6 mg/kg, în conformitate cu un regim de dozare q4dx3.

Figura 15 arată volumele tumorale ale șoarecilor CB17-SCID implantați cu NCI-H2110 individuali, precum și media grupului și SEM, în ziua 24. Grupurile au fost tratate intravenos cu vehicul (PBS), sau cu eribulină la 0,5, 0,2, 0,8, sau 1,6 mg/kg, în conformitate cu un regim de dozare q4dx3.

Figura 16 arată cinetica schimbării greutatei corporale pentru fiecare grup de șoareci CB17-SCID implantați cu NCI-H2110 (media grupului și SEM) tratați intravenos cu vehicul (PBS) sau cu eribulină la 0,5, 0,2, 0,8, sau 1,6 mg/kg, în conformitate cu un regim de dozare q4dx3.

Figura 17 arată potența MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) pe celule IGROV1, OVCAR3, NCI-H2110, A431-A3, și SJSA-1, așa cum este măsurată prin testul de citotoxicitate cu violet de gențiană.

Figura 18 arată cinetica creșterii tumorii pentru fiecare grup de șoareci CB17-SCID implantați cu NCI-H2110 (media grupului și SEM) tratați cu o singură doză intravenoasă de PBS, sau MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 1, 2,5, sau 5 mg/kg.

Figurile 19A și 19B arată cinetica creșterii tumorii (Figura 19A) și cinetica schimbării greutatei corporale (Figura 19B) pentru fiecare grup de șoareci purtători de tumori NSCLC PDx (LXFA-737) (media grupului și SEM) tratați cu o singură doză intravenoasă de vehicul (PBS), MORAb-003 la 5 mg/kg, sau MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 5 mg/kg.

Figurile 20A și 20B arată rapoartele volumului tumorii individual (Figura 20A) și cinetica schimbării greutatei corporale (Figura 20B) pentru fiecare grup de șoareci purtători de tumori cu cancer endometrial PDx (Endo-12961) (media grupului și SEM) tratați cu o singură doză intravenoasă de PBS, eribulină la 0,1 sau 3,2 mg/kg, sau MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 5 mg/kg. Figurile 20C și 20D arată cinetica creșterii tumorii (Figura 20C) și cinetica schimbării greutatei corporale (Figura 20D) pentru fiecare grup de șoareci purtători de tumori cu cancer endometrial PDx (Endo-10590) (media grupului și SEM) tratați cu o singură doză intravenoasă de PBS, eribulină la 0,1 sau 3,2 mg/kg, sau MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 5 mg/kg.

Figura 21A arată colorarea imunohistochimică (IHC) a țesutului tumoral la șoareci purtători de tumori TNBC PDx (OD-BRE-0631) cu un anticorp anti-IgG umană. Țesuturile tumorale de la șoarecii tratați cu o singură doză intravenoasă de vehicul (dreapta) sau MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 5 mg/kg (stanga), au fost colectate și colorate după 5 zile de la tratament. Figura 21B arată colorarea IHC a țesutului tumoral la șoareci purtători de tumori TNBC PDx (OD-BRE-0631) cu un anticorp α -actină a mușchiului neted (SMA)-FITC. Țesuturile tumorale de la șoarecii netratați au fost colectate cu 2 zile înainte de tratament (stânga), în timp ce țesuturile tumorale de la șoarecii tratați cu o singură doză intravenoasă de MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 5 mg/kg au fost colectate după 5 zile de la tratament (dreapta). Figura 21C arată cineticile de creștere a tumorilor pentru fiecare grup de șoareci purtători de tumori TNBC PDx (OD-BRE-0631) (media grupului și SEM) tratați cu o singură doză intravenoasă de vehicul (PBS), sau MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 5 mg/kg.

Figura 22 arată diferențierea celulelor stem mezenchimale ale măduvei osoase umane (BM-MSC-uri) în cultură cu celule MKN-74 după tratamentul cu vehicul (PBS sau etanol), eribulină, MORAb-003, sau MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202), așa cum este măsurată prin analiza citometriei în flux. Stro-1⁺/CD105⁺, CD34⁺/CD31⁻, și NG2⁺ sunt markeri ai MSC-urilor, adipocitelor, și pericitelor, respectiv.

Figura 23 arată analiza cursului în timp a țesuturilor tumorale de la șoareci CB17-SCID implantați cu NCI-H2110 tratați cu o singură doză intravenoasă de vehicul (PBS) sau MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) la 5 mg/kg, colorate cu un anticorp α -actină a mușchiului neted (SMA)-FITC. Țesuturile tumorale au fost colectate și colorate în ziua 0, și în zilele 3, 5, 7 și 9 post-tratament. Axa Y: % = [celule colorate numărate/celule totale numărate] * 100. Axa X: ziua (celule totale numărate).

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Compozițiile și metodele descrise pot fi înțelese cu mai multă ușurință prin referire la următoarea descriere detaliată luată în legătură cu figurile însoțitoare, care fac parte din această descriere a invenției. Trebuie să se înțeleagă că compozițiile și metodele descrise nu sunt limitate la compozițiile și metodele specifice descrise și/sau prezentate în acest document. Domeniul de aplicare al invenției este definit de revendicări.

De la un capăt la altul al acestui text, descrierile se referă la compoziții și metode pentru utilizarea respectivelor compoziții. Acolo unde descrierea descrie sau revendică o caracteristică

sau o dezvoltare asociată cu o compoziție, o astfel de caracteristică sau dezvoltare este aplicabilă în mod egal metodelor pentru utilizarea respectivei compoziții. La fel, acolo unde descrierea invenției descrie sau revendică o caracteristică sau o dezvoltare asociată cu o metodă pentru utilizarea unei compoziții, o astfel de caracteristică sau dezvoltare se aplică în mod egal compoziției.

Atunci când este exprimat un interval de valori, acesta include divulgări folosind orice valoare particulară din cadrul intervalului. Mai mult decât atât, referința la valorile declarate în intervale include fiecare și toate valorile din cadrul acelui interval. Toate intervalele includ punctele lor finale și pot fi combinate. Atunci când valorile sunt exprimate ca aproximări, prin utilizarea antecedentului "aproximativ", se va înțelege că valoarea particulară formează o altă dezvoltare. Referirea la o valoare numerică particulară include cel puțin acea valoare particulară, cu excepția cazului în care contextul dictează în mod clar altfel. Utilizarea lui "sau" va însemna "și/sau", cu excepția cazului în care contextul specific al utilizării sale dictează altfel. În cazul în care o referință și specificația intră în conflict, specificația va avea prioritate.

Trebuie apreciat faptul că anumite caracteristici ale compozițiilor și metodelor făcute cunoscute, care sunt, pentru claritate, descrise în acest document în contextul dezvoltărilor separate, pot fi furnizate, de asemenea, în combinație într-o singură dezvoltare. Invers, diverse caracteristici ale compozițiilor și metodelor făcute cunoscute, care sunt descrise, pentru exprimare concisă, în contextul unei singure dezvoltări, pot fi, de asemenea, descrise separat sau în orice subcombinație.

Definiții

Diverși termeni referitori la aspecte ale descrierii sunt folosiți de la un capăt la celălalt al specificației și revendicărilor. Unor astfel de termeni urmează să le fie atribuită semnificația lor obișnuită în domeniul de specialitate, cu excepția cazului în care se indică în alt fel. Alți termeni definiți în mod specific urmează să fie interpretați într-o manieră compatibilă cu definițiile descrise în acest document.

Așa cum se utilizează în acest document, formele de singular "o", "un" și formele cu articol hotărât includ formele de plural, cu excepția cazului în care contextul dictează în mod clar în alt fel.

Termenii "aproximativ" sau "in jur de" în contextul valorilor și intervalelor numerice se referă la valori sau intervale care aproximează sau sunt apropiate de valorile sau intervalele enumerate, astfel încât descrierea invenției poate funcționa așa cum se intenționează, cum ar fi a avea o cantitate dorită de acizi nucleici sau polipeptide într-un amestec de reacție, așa cum este evident pentru persoana de specialitate din expunerile conținute în acest document. Acest lucru se datorează, cel puțin parțial, proprietăților care variază ale compozițiilor de acid nucleic, vârstei, rasei, sexului, variațiilor anatomice și fiziologice și inexactitudinii sistemelor biologice. Astfel, acești termeni cuprind valori dincolo de cele rezultate din eroarea sistematică.

Termenii "conjugat anticorp-medicament", "conjugat de anticorp", "conjugat", "imunconjugat", și "ADC" sunt utilizați în mod interschimbabil, și se referă la un compus sau derivat al acestuia care este legat la un anticorp (de exemplu, un anticorp anti-FRA) și este definit de formula generică: $Ab-(L-D)_p$ (Formula I), în care Ab = o porțiune indivizibilă de anticorp (adică, anticorp sau fragment de legare la antigen), L = o porțiune indivizibilă linker, D = o porțiune indivizibilă de medicament, și p = numărul de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp.

Termenul "anticorp" este utilizat în sensul cel mai larg pentru a se referi la o moleculă de imunoglobulină care recunoaște și se leagă în mod specific la o țintă, cum ar fi o proteină, polipeptidă, carbohidrat, polinucleotidă, lipidă, sau combinații ale celor de mai înainte prin cel puțin un situs de recunoaștere a antigenului în cadrul regiunii variabile a moleculei de imunoglobulină. Lanțul greu al unui anticorp este alcătuit dintr-un domeniu variabil al lanțului greu (V_H) și o regiune constantă a lanțului greu (C_H). Lanțul ușor este alcătuit dintr-un domeniu variabil al lanțului ușor (V_L) și un domeniu constant al lanțului ușor (C_L). În sensul acestei aplicații, domeniile variabile ale lanțului greu și ale lanțului ușor mature cuprind, fiecare, trei regiuni de determinare a complementarității (CDR1, CDR2 și CDR3) în cadrul a patru regiuni cadru (FR1, FR2, FR3 și FR4) dispuse de la capătul N-terminal până la capătul C-terminal: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 și FR4. Un "anticorp" poate fi de origine naturală sau creat de om, cum ar fi anticorpii monoclonali produși prin tehnologia convențională a hibridomului. Termenul "anticorp" include anticorpi monoclonali de lungime completă și anticorpi policlonali de lungime completă, precum și fragmente de anticorpi cum ar fi Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, și anticorpi cu lanț unic. Un anticorp poate fi oricare dintre cele cinci clase majore de imunoglobuline: IgA, IgD, IgE, IgG, și IgM, sau subclassele acestora (de exemplu, izotipurile IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Termenul cuprinde suplimentar anticorpi umani, anticorpi chimerici, anticorpi umanizați și orice

moleculă de imunoglobulină modificată care conține un situs de recunoaștere a antigenului, atât timp cât demonstrează activitatea biologică dorită.

Termenul "anticorp monoclonal", așa cum este utilizat în acest document, se referă la un anticorp obținut dintr-o populație de anticorpi în mod substanțial omogeni, adică, anticorpii individuali care cuprind populația sunt identici, cu excepția posibilelor mutații de origine naturală care pot fi prezente în cantități minore. Anticorpii monoclonali sunt foarte specifici, fiind direcționați împotriva unui singur epitop antigenic. În contrast, preparatele convenționale de anticorp (policlonal) includ în mod obișnuit o multitudine de anticorpi direcționați împotriva (sau specifici pentru) epitopi diferiți. Modificatorul "monoclonal" arată caracterul anticorpului ca fiind obținut dintr-o populație de anticorpi în mod substanțial omogenă, și nu trebuie să fie interpretat ca necesitând producerea anticorpului prin orice metodă particulară. Pentru exemplificare, anticorpii monoclonali care urmează să fie utilizați în conformitate cu prezenta descriere a invenției pot fi realizați prin metoda hibridom care a fost descrisă mai întâi de către Kohler și colab., (1975) Nature, 256: 495, sau pot fi realizați prin metode de ADN recombinant (a se vedea, de exemplu, brevetul de invenție U.S. numărul 4.816.567). Anticorpii monoclonali pot fi izolați, de asemenea, din biblioteci de anticorpi fagi utilizând tehnicile descrise în Clackson și colab., (1991) Nature, 352: 624-8, și Marks și colab., (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-97, pentru exemplificare.

Anticorpii monoclonali descriși în acest document includ în mod specific anticorpi "chimerici" în care o porțiune a lanțului greu și/sau ușor este identică sau omologă cu secvențele corespunzătoare din anticorpi derivați dintr-o specie particulară sau care aparțin unei clase sau subclase particulare de anticorpi, în timp ce restul lanțului (lanțurilor) este identic cu, sau omolog cu secvențele corespunzătoare în anticorpii derivați de la o altă specie sau care aparțin unei alte clase sau subclase de anticorpi, precum și fragmentele unor astfel de anticorpi, atât timp cât acestea leagă în mod specific antigenul țintă și/sau prezintă activitatea biologică dorită.

Termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat în acest document, se referă la un anticorp produs de un om sau un anticorp având o secvență de aminoacizi a unui anticorp produs de un om.

Termenul "anticorp chimeric", așa cum este utilizat în acest document, se referă la anticorpi în care secvența de aminoacizi a moleculei de imunoglobulină este derivată de la două sau mai multe specii. În unele cazuri, regiunile variabile atât ale lanțurilor grele cât și ușoare corespund regiunilor variabile ale anticorpilor derivați de la o specie cu specificitatea, afinitatea și activitatea dorite, în timp ce regiunile constante sunt omologe cu anticorpii derivați de la o altă specie (de exemplu, om) pentru a minimiza un răspuns imun în ultima specie.

Așa cum este utilizat în acest document, termenul "anticorp umanizat" se referă la forme de anticorpi care conțin secvențe de la anticorpi non-umani (de exemplu, murini), precum și anticorpi umani. Astfel de anticorpi sunt anticorpi chimerici care conțin o secvență minimă derivată din imunoglobulina non-umană. În general, anticorpul umanizat va cuprinde în mod substanțial toate domeniile variabile dintre cel puțin unul și, în mod tipic, două, în care toate sau în mod substanțial toate buclele hipervariabile corespund cu cele ale unei imunoglobuline non-umane și toate sau în mod substanțial toate regiunile cadru (FR) sunt cele ale unei secvențe de imunoglobulină umană. Anticorpul umanizat va cuprinde, opțional, de asemenea, cel puțin o porțiune dintr-o regiune constantă a imunoglobulinei (Fc), în mod tipic aceea a unei imunoglobuline umane. Anticorpul umanizat poate fi modificat în continuare prin substituția reziduurilor, în oricare dintre regiunea cadru Fv și/sau în interiorul reziduurilor non-umane înlocuite pentru a rafina și optimiza specificitatea, afinitatea și/sau activitatea anticorpului.

Termenul "fragment de legare la antigen" sau "porțiune de legare la antigen" a unui anticorp, așa cum este utilizat în acest document, se referă la unul sau mai multe fragmente ale unui anticorp care păstrează capacitatea de a se lega în mod specific la un antigen (de exemplu, FRA). Fragmentele de legare la antigen păstrează preferabil, de asemenea, capacitatea de a se internaliza într-o celulă care exprimă antigenul. În unele descrieri, fragmentele de legare la antigen păstrează, de asemenea, activitatea efectoră imună. A fost demonstrat faptul că fragmente ale unui anticorp de lungime completă pot îndeplini funcția de legare la antigen a unui anticorp de lungime completă. Exemplele de fragmente de legare cuprinse în cadrul termenului "fragment de legare la antigen" sau "porțiune de legare la antigen" a unui anticorp includ (i) un fragment Fab, un fragment monovalent care este constituit din domeniile V_L , V_H , C_L , și C_{H1} ; (ii) un fragment $F(ab')_2$, un fragment bivalent care cuprinde două fragmente Fab legate printr-o punte disulfurică în regiunea balama; (iii) un fragment Fd care este constituit din domeniile V_H și C_{H1} ; (iv) un fragment Fv care este constituit din domeniile V_L și V_H ale unui singur braț al unui anticorp; (v) un fragment dAb, care cuprinde un singur domeniu variabil, de exemplu, un domeniu V_H (a se vedea, de exemplu, Ward și colab., (1989) Nature, 341: 544-6; și Winter și colab., WO 90/05144); și (vi) o regiune de determinare a complementarității (CDR) izolată. Mai mult decât atât, cu toate că cele două

domenii ale fragmentului Fv, V_L și V_H, sunt codificate de gene separate, acestea pot fi unite, folosind metode recombinante, printr-un linker sintetic care le permite să fie realizate ca un singur lanț proteic în care regiunile V_L și V_H se împerechează pentru a forma molecule monovalente (cunoscute sub numele de Fv cu un singur lanț (scFv)). *A se vedea, de exemplu*, Bird și colab., (1988) Science, 242: 423-6; și Huston și colab., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83. Se intenționează ca astfel de anticorpi cu un singur lanț să fie cuprinși, de asemenea, în cadrul termenului "fragment de legare la antigen" sau "porțiune de legare la antigen" a unui anticorp, și sunt cunoscuți în domeniu ca un tip exemplar de fragment de legare care se poate internaliza în celule la legare. *A se vedea, de exemplu*, Zhu și colab., (2010) 9: 2131-41; He și colab., (2010) J. Nucl. Med., 51: 427-32; și Fitting și colab., (2015) MAbs 7: 390 - 402. Așa cum se descrie în acest document, moleculele scFv pot fi incorporate într-o proteină de fuziune. Sunt cuprinse, de asemenea, alte forme de anticorpi cu lanț unic, cum ar fi diacorpții. Diacorpții sunt anticorpi bivalenți, bispecfici, în care domeniile V_H și V_L sunt exprimate pe un singur lanț polipeptidic, dar folosind un linker care este prea scurt pentru a permite împerecherea între cele două domenii pe același lanț, forțând astfel domeniile să se împerecheze cu domenii complementare ale altui lanț și creând două situsuri de legare la antigen (a se vedea de exemplu, Holliger și colab., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-8; și Poljak și colab., (1994) Structure, 2: 1121-3). Fragmentele de legare la antigen sunt obținute folosind tehnici convenționale cunoscute celor care au pregătire în domeniul de specialitate, și fragmentele de legare sunt examinate pentru utilitate (de exemplu, afinitate de legare, internalizare) în același mod ca și anticorpul intact. Fragmentele de legare la antigen pot fi preparate prin scindarea proteinei intacte, de exemplu, prin protează sau scindare chimică.

"Internalizare", așa cum este utilizat în acest document cu referire la un anticorp sau un fragment de legare la antigen, se referă la un anticorp sau un fragment de legare la antigen care este capabil de a fi preluat prin membrana bistratului lipidic al celulei la un compartiment intern (adică "internalizat") la legarea la celulă, preferabil într-un compartiment de degradare în celulă. Pentru exemplificare, un anticorp anti-FRA de internalizare este unul care poate fi luat în celulă după legarea la FRA pe membrana celulei.

Termenul "receptorul alfa al folatului" sau "FRA", așa cum este utilizat în acest document, se referă la orice formă nativă de FRA uman. Termenul cuprinde FRA de lungime completă (de exemplu, secvența de referință NCBI: NP_000793; ID. SECV. NR.: 19), precum și orice formă de FRA uman care rezultă din procesarea celulară. Termenul cuprinde, de asemenea, variante de origine naturală ale FRA, incluzând, dar fără a se limita la, variantele de îmbinare, variantele alelice, și izoformele. FRA poate fi izolat de la un om, sau poate fi produs recombinant sau prin metode sintetice.

Termenul "anticorp anti-FRA" sau "anticorp care se leagă în mod specific la FRA" se referă la orice formă de anticorp sau fragment al acestuia care se leagă în mod specific la FRA, și cuprinde anticorpi monoclonali (inclusiv anticorpi monoclonali de lungime completă), anticorpi policlonali, și fragmente de anticorpi funcționali din punct de vedere biologic atât timp cât aceștia se leagă în mod specific la FRA. Preferabil, anticorpul anti-FRA utilizat în ADC-urile făcute cunoscute în acest document este un anticorp de internalizare sau fragment de anticorp de internalizare. MORAb-003 este un anticorp anti-FRA uman de internalizare cu titlu de exemplu. Așa cum sunt utilizați în acest document, termenii "specific", "se leagă în mod specific" și "leagă în mod specific" se referă la legarea selectivă a anticorpului la epitopul antigenului țintă. Anticorpul pot fi testați pentru specificitatea legării prin compararea legării la antigenul corespunzător cu legarea la antigenul irelevant sau amestecul de antigen într-un set dat de condiții. Dacă anticorpul se leagă la antigenul corespunzător cu de cel puțin 2, 5, 7 și preferabil 10 ori mai multă afinitate decât la antigenul irelevant sau amestecul de antigen, atunci acesta este considerat că este specific. Așa cum se descrie în acest document, un anticorp specific este unul care leagă doar antigenul FRA, dar nu se leagă (sau prezintă o legare minimă) la alți antigeni.

Termenul "receptorul factorului de creștere epidermică uman 2", "her2", sau "her2/neu", așa cum este utilizat în acest document, se referă la orice formă nativă de her2 uman. Termenul cuprinde her2 de lungime completă (de exemplu, secvența de referință NCBI: NP_004439.2; ID. SECV. NR.: 21), precum și orice formă de her2 uman care rezultă din procesarea celulară. Termenul cuprinde, de asemenea, variante de origine naturală ale her2, incluzând, dar fără a se limita la, variantele de îmbinare, variantele alelice, și izoformele. Her2 poate fi izolat de la om, sau poate fi produs recombinant sau prin metode sintetice.

Termenul "anticorp anti-her2" sau "anticorp care se leagă în mod specific la her2" se referă la orice formă de anticorp sau fragment al acestuia care se leagă în mod specific la her2, și cuprinde anticorpi monoclonali (inclusiv anticorpi monoclonali de lungime completă), anticorpi policlonali, și fragmente de anticorpi funcționali din punct de vedere biologic atât timp cât aceștia

se leagă în mod specific la her2. Brevetul de invenție U.S. nr. 5.821.337 oferă secvențe de legare la her2 cu titlu de exemplu, inclusiv secvențe de anticorp anti-her2 cu titlu de exemplu. Preferabil, anticorpul anti-her2 utilizat în ADC-urile făcute cunoscute în acest document este un anticorp de internalizare sau fragment de anticorp de internalizare. Trastuzumab este un anticorp anti-her2 uman de internalizare cu titlu de exemplu.

Termenul "epitop" se referă la porțiunea unui antigen capabilă să fie recunoscută și legată în mod specific de un anticorp. Atunci când antigenul este o polipeptidă, epitopii pot fi formați din aminoacizi continui sau aminoacizi necontinui juxtapuși prin plierea terțiară a polipeptidei. Epitopul legat de un anticorp poate fi identificat folosind orice tehnică de mapare a epitopului cunoscută în domeniul de specialitate, inclusiv cristalografia cu raze X pentru identificarea epitopului prin vizualizarea directă a complexului antigen-anticorp, precum și monitorizarea legării anticorpului la fragmente ale antigenului sau variații care au suferit mutație ale antigenului, sau monitorizarea accesibilității la solvent a diferitelor părți ale anticorpului și ale antigenului. Strategii cu titlu de exemplu utilizate pentru a mapa epitopii de anticorpi includ, dar nu sunt limitate la, scanare oligo-peptidică bazată pe matrice, proteoliză limitată, mutagenză direcționată spre situs, mapare de mutagenză cu randament ridicat, schimb hidrogen-deuteriu, și spectrometrie de masă (a se vedea, de exemplu, Gershoni et al. și colab., (2007) 21: 145-56; și Hager-Braun și Tomer, (2005) Expert Rev. Proteomics, 2: 745-56).

Legarea competitivă și legarea epitopului (epitope binning) pot fi utilizate, de asemenea, pentru a determina anticorpilor care partajează epitopi identici sau care se suprapun. Legarea competitivă poate fi evaluată utilizând o analiză de blocare încrucișată, cum ar fi analiza descrisă în "Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow și Lane (prima ediție, 1988, ediția a II-a, 2014). Așa cum se descrie în acest document, legarea competitivă este identificată atunci când un anticorp de test sau o proteină de legare reduce legarea unui anticorp de referință sau a unei proteine de legare de referință la un antigen țintă cum ar fi FRA sau her2 (de exemplu, o proteină de legare care cuprinde CDR-uri și/sau domenii variabile selectate dintre cele identificate în Tabelele 2, 4 și 6), cu cel puțin aproximativ 50% în analiza de blocare încrucișată (de exemplu, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5%, sau mai mult, sau orice procent între ele), și/sau invers. Așa cum se descrie în acest document, legarea competitivă se poate datora epitopilor partajați sau similari (de exemplu, care se suprapun parțial), sau se poate datora obstacolelor sterice acolo unde anticorpilor sau proteinele de legare se leagă la epitopii din apropiere. A se vedea, de exemplu, Tzartos, Methods in Molecular Biology (Morris, ed. (1998) vol. 66, p. 55 - 66). Așa cum se descrie în acest document, legarea competitivă poate fi utilizată pentru a sorta grupuri de proteine de legare care partajează epitopi similari, de exemplu, cei care concurează pentru legare pot fi "grupați" ("binned") ca un grup de proteine de legare care au epitopi care se suprapun sau în apropiere, în timp ce cei care nu concurează sunt plasați într-un grup separat de proteine de legare care nu au epitopi care se suprapun sau în apropiere.

Termenul " k_{on} " sau " k_a " se referă la constanta vitezei de asociere pentru asocierea unui anticorp la antigen pentru a forma complexul anticorp/antigen. Viteza poate fi determinată utilizând analize standard, cum ar fi o analiză Biacore sau ELISA.

Termenul " k_{off} " sau " k_d " se referă la constanta vitezei de disociere pentru disocierea unui anticorp din complexul anticorp/antigen. Viteza poate fi determinată utilizând analize standard, cum ar fi o analiză Biacore sau ELISA.

Termenul " K_D " se referă la constanta de disociere la echilibru a unei interacțiuni anticorp-antigen particulare. K_D este calculată prin k_a/k_d . Viteza poate fi determinată utilizând analize standard, cum ar fi o analiză Biacore sau ELISA.

Termenul " p " sau "raport anticorp:medicament" sau "raport medicament-anticorp" sau "DAR" se referă la numărul de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp, adică la încărcarea medicamentului, sau la numărul de porțiuni indivizibile -L-D per anticorp sau fragment de legare la antigen (Ab) în ADC-urile cu Formula I. În compozițiile care cuprind mai multe copii ale ADC-urilor cu Formula I, " p " se referă la numărul mediu de porțiuni indivizibile -L-D per anticorp sau fragment de legare la antigen, menționat, de asemenea, ca încărcare medie a medicamentului.

Un "linker" sau "porțiune indivizibilă linker" este orice porțiune indivizibilă chimică ce este capabilă să unească în mod covalent un compus, de obicei o porțiune indivizibilă de medicament cum ar fi un agent chimioterapeutic, la o altă porțiune indivizibilă cum ar fi o porțiune indivizibilă de anticorp. Linkerii pot fi sensibili la, sau în mod substanțial rezistenți la scindarea indusă de acid, scindarea indusă de peptidază, scindarea pe bază de lumină, scindarea indusă de esterază, și/sau scindarea legăturii disulfură, în condițiile în care compusul sau anticorpul rămâne activ.

Termenul "agent" este utilizat în acest document pentru a se referi la un compus chimic, un amestec de compuși chimici, o macromoleculă biologică, sau un extract realizat din materiale biologice. Termenii "agent terapeutic", "medicament" sau "porțiune indivizibilă de medicament" se referă la un agent care este capabil să moduleze un proces biologic și/sau are activitate biologică.

Termenul "agent chimioterapeutic" sau "agent anti-cancer" este utilizat în acest document pentru a se referi la toți compușii chimici care sunt eficienți în tratarea cancerului indiferent de mecanismul de acțiune. Inhibarea metastazelor sau angiogenezei este în mod frecvent o proprietate a unui agent chimioterapeutic. Exemplele care nu sunt limitative de agenți chimioterapeutici includ agenți de alchilare, pentru exemplificare, muștaruri de azot, compuși de etilenimină, și sulfonați de alchil; antimetaboliți, pentru exemplificare, antagoniști ai acidului folic, purinei sau pirimidinei; agenți anti-mitotici, pentru exemplificare, agenți anti-tubulină cum ar fi eribulina sau mesilatul de eribulină (Halaven™) sau derivații acestora, alcaloizi vinca, și auristatine; antibiotice citotoxice; compuși care deteriorează sau interferează cu exprimarea sau replicarea ADN-ului, pentru exemplificare, lanți la nivelul cavității mici a ADN; și antagoniști ai receptorului factorului de creștere. În plus, agenții chimioterapeutici includ anticorpi, molecule biologice, și molecule mici. Un agent chimioterapeutic poate fi un agent citotoxic sau citostatic. Termenul "agent citostatic" se referă la un agent care inhibă sau suprimă creșterea celulară și/sau multiplicarea celulelor.

Termenul "agent citotoxic" se referă la o substanță care cauzează moartea celulelor în primul rând prin interferența cu o activitate de exprimare a celulei și/sau cu funcționarea unei celule. Exemplele de agenți citotoxici includ, dar nu se limitează la, agenți anti-mitotici, cum ar fi eribulină, auristatine (de exemplu, monometil auristatină E (MMAE), monometil auristatină F (MMAF)), maitansinoide (de exemplu, maitansine), dolastatine, duostatine, criptoficine, alcaloizi vinca (de exemplu, vincristină, vinblastină), taxani, taxoli, și colchicine; antracicline (de exemplu, daunorubicină, doxorubicină, dihidroxiantracindionă); antibiotice citotoxice (de exemplu, mitomicine, actinomicine, duocarmicine (de exemplu, CC-1065), auromicine, duomicine, calicheamicine, endomicine, fenomicine); agenți de alchilare (de exemplu, cisplatină); agenți de intercalare (de exemplu, bromură de etidiu); inhibitori de topoizomerază (de exemplu, etopozid, tenopozid); radioizotopi, cum ar fi At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} sau ^{213}P , ^{32}P , și izotopi radioactivi ai lutețiului (de exemplu, Lu^{177}); și toxine de origine bacteriană, fungică, vegetală sau animală (de exemplu, ricină (de exemplu, lanțul A de ricină), toxina difterică, exotoxina *Pseudomonas A* (de exemplu, PE40), endotoxină, mitogelină, combrestatină, restrictocină, gelonină, alfa-sarcină, abrină (de exemplu, lanț A de abrină), modeccină (de exemplu, lanț A de modeccină), curicină, crotină, inhibitor de *Sapaonaria officinalis*, glucocorticoid).

Termenul "eribulină", așa cum este utilizat în acest document, se referă la un analog sintetic al halicondrinei B, un compus macrociclic care a fost izolat inițial din buretele marin *Halichondria okadae*. Termenul "porțiune indivizibilă de medicament de eribulină" se referă la componenta unui ADC care are structura eribulinei, și este atașată la linkerul ADC-ului prin intermediul aminei sale C-35. Eribulina este un inhibitor al dinamicii microtubulilor, despre care se crede că se leagă la tubulină și induce oprirea ciclului celular în faza G2/M prin inhibarea ansamblului fusului mitotic. Termenul "mesilat de eribulină" se referă la sarea de mesilat a eribulinei, care este comercializată sub denumirea comercială Halaven™.

Termenul "omolog" se referă la o moleculă care prezintă omologie față de o altă moleculă, prin faptul că are, pentru exemplificare, secvențe de reziduuri chimice care sunt aceleași sau similare la pozițiile corespunzătoare.

Termenul "inhibă" sau "inhibare a", așa cum este utilizat în acest document, înseamnă reducerea cu o cantitate măsurabilă și poate include, dar nu necesită prevenire sau inhibare completă.

Termenul "țintă-negativ" sau "antigen-negativ țintă" se referă la absența exprimării antigenului țintă de către o celulă sau un țesut. Termenul "țintă-pozitiv" sau "antigen-pozitiv țintă" se referă la prezența exprimării antigenului țintă. Pentru exemplificare, o celulă sau o linie de celule care nu exprimă un antigen țintă poate fi descrisă ca țintă-negativă, în timp ce o celulă sau o linie de celule care exprimă un antigen țintă poate fi descrisă ca fiind țintă-pozitivă.

Termenul "ucidere a vecinătăților" sau "efect asupra vecinătăților" se referă la uciderea celulelor țintă-negative în prezența celulelor țintă-pozitive, unde uciderea celulelor țintă-negative nu este observată în absența celulelor țintă-pozitive. Contactul celulă-la-celulă, sau cel puțin proximitatea între celulele țintă-pozitive și țintă-negative, permite uciderea vecinătăților. Acest tip de ucidere se distinge de "ucidere departe de țintă," care se referă la uciderea fără discriminare a celulelor țintă-negative. "Uciderea departe de țintă" poate fi observată în absența celulelor țintă-pozitive.

Termenul "cancer" se referă la starea fiziologică la mamifere în care o populație de celule este caracterizată de creștere celulară nereglementată. Exemplele de cancer includ, dar nu sunt limitate la, carcinom, limfom, blastom, sarcom, și leucemie. Exemple mai particulare de astfel de

5 cancer includ cancerul cu celule scuamoase, cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul pulmonar cu celule non-mici, adenocarcinomul pulmonar, carcinomul scuamos al plămânului, cancerul peritoneului, cancerul hepatocelular, cancerul gastro-intestinal, cancerul pancreatic, glioblastomul, cancerul de col uterin, cancerul ovarian, cancerul de ficat, cancerul de vezică urinară, hepatomul, cancerul de san (de exemplu, cancerul de san triplu negativ), osteosarcomul, melanomul, cancerul

10 de colon, cancerul colorectal, cancerul endometrial (de exemplu, seros) sau uterin, carcinomul glandei salivare, cancerul de rinichi, cancerul de ficat, cancerul de prostată, cancerul vulval, cancerul tiroidian, carcinomul hepatic, și diferite tipuri de cancer de cap și gât. Cancerul de sân triplu negativ se referă la cancerul de sân care este negativ pentru exprimarea genelor pentru receptorul de estrogen (ER), receptorul de progesteron (PR), sau Her2/neu.

Termenii "tumoră" și "neoplasm" se referă la orice masă de țesut care rezultă din

15 creșterea sau proliferarea excesivă a celulelor, fie benignă, fie malignă, inclusiv leziuni precanceroase.

Termenii "celulă canceroasă" și "celulă tumorală" se referă la celule individuale sau la populația totală de celule derivate dintr-o tumoră, incluzând atât celule non-tumorigene, cat și celule stem canceroase. Așa cum este utilizat în acest document, termenul "celulă tumorală" va fi

20 modificat prin termenul "non-tumorigen" atunci când se referă exclusiv la acele celule tumorale care sunt lipsite de capacitatea de a se reinnoi și diferenția pentru a distinge acele celule tumorale de celulele stem canceroase.

Termenii "subiect" și "pacient" sunt folosiți în mod interschimbabil în acest document pentru a se referi la orice animal, cum ar fi orice mamifer, incluzând, dar fără a se limita la,

25 oameni, primate non-umane, rozătoare, și altele asemenea. Așa cum se descrie în acest document, mamiferul este un șoarece. Așa cum se descrie în acest document, mamiferul este un om.

Termenul "co-administrare" sau administrare "în combinație cu" unul sau mai mulți agenți terapeutici include administrarea concurentă și consecutivă în orice ordine.

O "compoziție farmaceutică" se referă la un preparat care este într-o astfel de formă încât

30 să permită administrarea și să furnizeze ulterior activitatea biologică intenționată a ingredientului activ (ingredientelor active) și/sau să obțină un efect terapeutic, și care nu conține componente suplimentare care sunt inacceptabil de toxice pentru un subiect căruia i s-ar administra formularea. Compoziția farmaceutică poate fi sterilă.

Un "excipient farmaceutic" cuprinde un material cum ar fi un adjuvant, un transportor,

35 agenți de ajustare a pH-ului și de tamponare, agenți de ajustare a tonicității, agenți de umectare, conservanți, și alții asemenea.

"Acceptabil din punct de vedere farmaceutic" înseamnă aprobat sau care poate fi aprobat de o agenție de reglementare a guvernului federal sau a unui guvern de stat, sau listat în Farmacopeia SUA sau în altă farmacopeie recunoscută în general, pentru utilizare la animale, și

40 mai în particular la oameni.

O "cantitate eficientă" dintr-un ADC așa cum este făcută cunoscută în acest document este o cantitate suficientă pentru a îndeplini un scop declarat în mod specific, pentru exemplificare pentru a produce un efect terapeutic după administrare, cum ar fi o reducere a ratei de creștere a tumorii sau a volumului tumorii, o reducere a unui simptom al cancerului, sau cateva alte indicii

45 ale eficacității tratamentului. O cantitate eficientă poate fi determinată într-o manieră de rutină în raport cu scopul declarat. Termenul "cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic" se referă la o cantitate dintr-un ADC eficientă pentru tratarea unei boli sau tulburări la un subiect. În cazul cancerului, o cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic de ADC poate reduce numărul de celule canceroase, poate reduce dimensiunea tumorii, poate inhiba (de exemplu, încetinește sau oprește) metastaza tumorii, poate inhiba (de exemplu, încetinește sau oprește) creșterea tumorii, și/sau poate ameliora unul sau mai multe simptome. O "cantitate eficientă din punct de vedere profilactic" se referă la o cantitate eficientă, la dozele și pentru perioadele de timp necesare, pentru a obține rezultatul profilactic dorit. De obicei, din moment ce o doză profilactică este utilizată la subiecți înainte de boală sau într-o etapă timpurie a bolii, cantitatea eficientă din punct de vedere

50 profilactic va fi mai mică decât cantitatea eficientă din punct de vedere terapeutic.

Așa cum se utilizează în acest document, "a trata" sau "terapeutic" și termenii asociați din punct de vedere gramatical, se referă la orice îmbunătățire a oricărei consecințe a bolii, cum ar fi supraviețuirea prelungită, morbiditate mai mică, și/sau o micșorare a efectelor secundare care sunt produsele secundare ale unei modalități terapeutice alternative. Așa cum este recunoscut cu

60 ușurință în domeniul de specialitate, eradicarea completă a bolii este o preferință, chiar dacă nu este o cerință pentru un act de tratament. "Tratament" sau "tratare", așa cum se utilizează în acest

document, se referă la administrarea către un subiect, de exemplu, un pacient, a unui ADC descris. Tratamentul poate fi pentru a vindeca, restaura, ameliora, ușura, altera, remedia, ameliora, a fi un paliativ, a îmbunătăți sau afecta tulburarea, simptomele tulburării sau predispoziția către tulburare, de exemplu, un cancer.

Așa cum se descrie în acest document, este utilizat un ADC etichetat. "Etichetele" adecvate includ radionuclizi, enzime, substraturi, cofactori, inhibitori, porțiuni indivizibile fluorescente, porțiuni indivizibile chimioluminescente, particule magnetice, și altele asemenea.

Prin "proteină", așa cum se utilizează în acest document, sunt înțeleși cel puțin doi aminoacizi atașați în mod covalent. Termenul cuprinde polipeptide, oligopeptide și peptide. Așa cum se descrie în acest document, cei doi sau mai mulți aminoacizi atașați în mod covalent sunt atașați printr-o legătură peptidică. Proteina poate fi făcută din aminoacizi de origine naturală și legături peptidice, pentru exemplificare atunci când proteina este fabricată recombinant utilizând sisteme de exprimare și celule gazdă. Alternativ, proteina poate include aminoacizi sintetici (de exemplu, homofenilalanină, citrulină, ornitină, și norleucină), sau structuri peptidomimetice, adică "analogi de peptide sau proteine", cum ar fi peptoizii. Peptoizii sunt o clasă de peptidomimetice cu titlu de exemplu ale căror lanțuri laterale sunt anexate la atomul de azot al structurii principale a peptidei, mai degrabă decât la atomii de carbon α (așa cum aceștia sunt în aminoacizi), și au legare la hidrogen diferită și caracteristici conformaționale diferite în comparație cu peptidele (a se vedea, de exemplu, Simon și colab., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9367). Ca atare, peptoizii pot fi rezistenți la proteoliză sau alte condiții fiziologice sau de depozitare, și pot fi eficienți la penetrarea membranelor celulare. Astfel de aminoacizi sintetici pot fi încorporați în particular atunci când anticorpul este sintetizat *in vitro* prin metode convenționale bine cunoscute în domeniul de specialitate. În plus, poate fi utilizată orice combinație de reziduuri/structuri peptidomimetice, sintetice și de origine naturală. "Aminoacid" include, de asemenea, reziduuri de aminoacizi, cum ar fi prolina și hidroxiprolina. Aminoacidul "grupa R" sau "lanț lateral" poate fi fie în configurația (L), fie în configurația (S). Așa cum se descrie în acest document, aminoacizii sunt în configurația (L) sau (S).

O "proteină recombinantă" este o proteină făcută utilizând tehnici recombinante utilizând orice tehnici și metode cunoscute în domeniul de specialitate, adică prin exprimarea unui acid nucleic recombinant. Metodele și tehnicile pentru producerea proteinelor recombinante sunt bine cunoscute în domeniul de specialitate.

O proteină "izolată" nu este acompaniată de cel puțin o parte din materialul cu care aceasta este asociată în mod normal în starea sa naturală, pentru exemplificare constituind cel puțin aproximativ 5% sau cel puțin aproximativ 50% din greutatea proteinei totale dintr-o probă dată. Se înțelege că proteina izolată poate constitui de la 5 până la 99,9% în greutate din conținutul total de proteine, în funcție de circumstanțe. Pentru exemplificare, proteina poate fi făcută la o concentrație semnificativ mai mare prin utilizarea unui promotor inductibil sau promotor de exprimare ridicată, astfel încât proteina este făcută la niveluri de concentrație crescute. Definiția include producerea unui anticorp într-o mare varietate de organisme și/sau celule gazdă care sunt cunoscute în domeniul de specialitate.

Pentru secvențele de aminoacizi, identitatea și/sau similaritatea secvenței pot fi determinate folosind tehnici standard cunoscute în domeniul de specialitate, incluzând, dar fără a se limita la, algoritmul de identitate locală a secvenței al lui Smith și Waterman, (1981) Adv. Appl. Math., 2: 482, algoritmul de aliniere de identitate a secvenței al lui Needleman și Wunsch, (1970) J. Mol. Biol., 48: 443, metoda de căutare pentru similaritate a lui Pearson și Lipman, (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 2444, implementările computerizate ale acestor algoritmi (GAP, BESTFIT, FASTA, și TFASTA în pachetul software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), programul de secvență Best Fit descris de Devereux și colab., (1984) Nucl. Acid Res., 12: 387-95, preferabil folosind setările implicite, sau prin inspecție. Preferabil, identitatea procentuală este calculată prin FastDB pe baza următorilor parametri: penalizare de nepotrivire de 1; penalizare de spațiu de 1; penalizare pentru dimensiunea spațiului de 0,33; și penalizarea de unire de 30 ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, p. 127 - 149 (1988), Alan R. Liss, Inc).

Un exemplu de un algoritmul util este PILEUP. PILEUP creează o aliniere multiplă de secvență dintr-un grup de secvențe conexe utilizând alinieri progresive, în pereche. Poate, de asemenea, să reprezinte grafic un arbore care arată relațiile de legătură de grupare utilizate pentru a crea alinierea. PILEUP folosește o simplificare a metodei de aliniere progresivă a lui Feng & Doolittle, (1987) J. Mol. Evol., 35: 351-60; metoda este similară cu cea descrisă de Higgins și Sharp, (1989) CABIOS, 5: 151-3. Parametrii PILEUP utili includ o greutate implicită a spațiului de 3,00, o greutate implicită a lungimii spațiului de 0,10, și spații finale ponderate.

Un alt exemplu de algoritm util este algoritmul BLAST, descris în: Altschul și colab., (1990) J. Mol. Biol., 215: 403-10; Altschul și colab., (1997) Nucleic Acids Res., 25: 3389-402; și Karin și colab., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-87. Un program BLAST deosebit de util este programul WU-BLAST-2 care a fost obținut din Altschul și colab., (1996) Methods in Enzymology, 266: 460-80. WU-BLAST-2 utilizează mai mulți parametri de căutare, dintre care cei mai mulți sunt setați la valorile implicite. Parametrii reglabili sunt setați cu următoarele valori: overlap span = 1, overlap fraction = 0,125, word threshold (T) = II. Parametrii HSP S și HSP S2 sunt valori dinamice și sunt stabiliți de programul însuși, în funcție de compoziția secvenței particulare și compoziția bazei de date particulare în raport cu care se caută secvența de interes; cu toate acestea, valorile pot fi ajustate pentru a crește sensibilitatea.

Un algoritm suplimentar util este BLAST spațiat, așa cum este raportat de Altschul și colab., (1993) Nucl. Acids Res., 25: 3389-402. BLAST spațiat folosește scoruri de substituție BLOSUM-62; parametrul T de prag setat la 9; metoda cu două lovituri pentru a declanșa extensii fără spații, încarcă lungimi de spațiu de k cu un cost de 10+k; Xu setat la 16, și Xg setat la 40 pentru etapa de căutare în baza de date și la 67 pentru etapa de ieșire a algoritmilor. Alinierile spațiate sunt declanșate de un scor care corespunde la aproximativ 22 de biți.

În general, omologia, similaritatea, sau identitatea aminoacizilor între proteinele făcute cunoscute în acest document și variantele acestora, inclusiv variante ale FRA, variante ale her2, variante ale secvențelor de tubulină, și variante ale domeniilor variabile de anticorpi (inclusiv CDR-uri variante individuale), sunt de cel puțin 80% cu secvențele descrise în acest document, și mai de obicei cu omologii sau identități de preferință crescătoare de cel puțin 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, și aproape 100% sau 100%.

Intr-un mod similar, "procent (%) de identitate de secvență de acid nucleic" în raport cu secvența de acid nucleic a anticorpilor și a altor proteine identificate în acest document este definit ca procentul de reziduuri de nucleotide dintr-o secvență candidat care sunt identice cu reziduurile de nucleotide din secvența de codificare a proteinei de legare la antigen. O metodă specifică utilizează modulul BLASTN al WU-BLAST-2 setat la parametrii implicați, cu overlap span și overlap fraction setați la 1 și 0,125, respectiv.

În timp ce situsul sau regiunea pentru introducerea unei variații a secvenței de aminoacizi este predeterminat, mutația în sine nu trebuie să fie predeterminată. Pentru exemplificare, pentru a optimiza performanța unei mutații la un situs dat, poate fi efectuată mutageneza aleatorie la codonul sau regiunea țintă și variantele CDR ale proteinei de legare la antigen exprimate sunt evaluate pentru combinația optimă a activității dorite. Tehnicile pentru realizarea mutațiilor de substituție la situsurile predeterminate din ADN având o secvență cunoscută sunt bine cunoscute, pentru exemplificare, mutageneza cu primer MI3 și mutageneza PCR.

Conjugati anticorp-medicament

Compușii din prezenta descriere a invenției îi includ pe cei cu activitate anti-cancer. În particular, compușii include o porțiune indivizibilă de anticorp (incluzând un fragment de legare la antigen al acestuia) conjugată (adică, atașată covalent de către un linker) la o porțiune indivizibilă de medicament, unde porțiunea indivizibilă de medicament, atunci când nu este conjugată la o porțiune indivizibilă de anticorp, are un efect citotoxic sau citostatic. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de medicament prezintă citotoxicitate redusă sau nicio citotoxicitate atunci când este legată într-un conjugat, dar revine la citotoxicitate după scindarea de linker și porțiunea indivizibilă de anticorp. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de medicament prezintă o ucidere redusă sau nicio ucidere a vecinătăților atunci când este legată într-un conjugat (de exemplu, utilizând un linker non-scindabil), dar prezintă o ucidere a vecinătăților crescută după scindarea dintr-un conjugat (de exemplu, un conjugat având o porțiune indivizibilă scindabilă Val-Cit care poate fi scindată).

Dezvoltarea și producția unui ADC pentru utilizare ca un agent terapeutic uman, de exemplu, ca un agent oncologic, poate necesita mai mult decât identificarea unui anticorp capabil să se lege la o țintă dorită sau la ținte dorite și să se atașeze la un medicament utilizat de unul singur la tratarea cancerului. Legarea anticorpului la medicament poate avea efecte semnificative și imprevizibile asupra activității unuia dintre, sau atât a anticorpului cât și medicamentului, efecte care vor varia în funcție de tipul linkerului și/sau medicamentului ales. Așa cum se descrie în acest document, prin urmare, componentele ADC-ului (i) a păstra una sau mai multe proprietăți terapeutice prezentate de anticorp și porțiunile indivizibile de medicament în izolare, (ii) a menține proprietățile de legare specifice ale porțiunii indivizibile de anticorp; (iii) a optimiza încărcarea medicamentului și rapoartele medicament-anticorp; (iv) a permite livrarea, de exemplu, livrarea intracelulară a porțiunii indivizibile de medicament prin intermediul atașării stabile la porțiunea indivizibilă de anticorp; (v) a păstra stabilitatea ADC ca un conjugat intact până la transportul sau livrarea la un situs țintă; (vi) a minimiza agregarea ADC-ului înainte de, sau după administrare;

(vii) a permite efectul terapeutic, de exemplu, efectul citotoxic, al porțiunii indivizibile de medicament după scindarea în mediul celular; (viii) a prezenta Eficacitate a tratamentului anti-cancer *in vivo* comparabilă cu, sau superioară celei a anticorpului și porțiunilor indivizibile de medicament în izolare; (ix) a minimiza uciderea departe de țintă de către porțiunea indivizibilă de medicament; și/sau (x) a prezenta proprietăți farmacocinetice și farmacodinamice, formulabilitate, și profiluri toxicologice/imunologice dorite. Este posibil să fie necesară examinarea fiecăreia dintre aceste proprietăți pentru a identifica un ADC îmbunătățit pentru uz terapeutic (Ab și colab., (2015) Mol. Cancer Ther., 14: 1605-13).

Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile făcute cunoscute în acest document prezintă proprietăți neașteptat de favorabile în unele sau fiecare dintre categoriile enumerate mai sus. De exemplu, așa cum se descrie în acest document, structurile ADC cuprinzând o atașare Mal la un anticorp, o unitate de distanțiere PEG (preferabil o unitate de distanțiere PEG scurtă), și/sau un linker scindabil peptidic (de exemplu, un linker Val-Cit) prezintă o încărcare a medicamentului, agregare și/sau profiluri de stabilitate surprinzător de favorabile, și/sau păstrează funcția de legare la anticorp, activitatea medicamentului, și/sau uciderea îmbunătățită a vecinătăților, în timp ce reduce uciderea departe de țintă, în comparație cu ADC-urile care utilizează alte structuri linker care pot fi scindate sau care nu pot fi scindate.

Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB care unește eribulina la un anticorp (de exemplu, un anticorp anti-FRA cum ar fi MORAb-003) prezintă proprietăți deosebit de favorabile în categoriile enumerate, în comparație cu alți linkeri care pot fi scindați sau care nu pot fi scindați care unesc eribulina la o porțiune indivizibilă de anticorp. Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB care unește eribulina la un anticorp (de exemplu, un anticorp anti-FRA cum ar fi MORAb-003) prezintă proprietăți de ucidere a vecinătăților deosebit de favorabile în comparație cu un ADC care nu poate fi scindat. Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB care unește eribulina la un anticorp (de exemplu, un anticorp anti-FRA cum ar fi MORAb-003) prezintă proprietăți de ucidere a vecinătăților deosebit de favorabile în comparație cu un ADC care utilizează structuri linker care pot fi scindate alternative.

Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB care unește eribulina la MORAb-003 prezintă un raport medicament:anticorp mai mare și mai de dorit (adică un raport de aproximativ 3 - 4) în raport cu un ADC, de exemplu, care cuprinde un linker atașat la anticorp prin intermediul unei porțiuni indivizibile alternative (de exemplu, o porțiune indivizibilă succinimidă). Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB care unește eribulina la MORAb-003 prezintă un raport medicament:anticorp mai mare și mai de dorit și/sau niveluri de agregare mai mici, în raport cu un ADC, de exemplu, care cuprinde o unitate de distanțiere mai lungă (de exemplu, (PEG)₈). Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB care unește eribulina la MORAb-003 demonstrează un raport medicament:anticorp mai mare și mai de dorit, niveluri de agregare mai mici, ucidere la țintă crescută, și/sau ucidere departe de țintă scăzută în raport cu un ADC, de exemplu, care cuprinde o porțiune indivizibilă care poate fi scindată alternativă (adică o porțiune indivizibilă care poate fi scindată non-peptidică, cum ar fi o disulfură sau sulfonamidă care poate fi scindată). Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB care unește eribulina la MORAb-003 demonstrează stabilitate crescută, ucidere la țintă crescută, ucidere departe de țintă scăzută, niveluri de agregare mai mici, și/sau un raport medicament:anticorp mai mare și mai de dorit în raport cu un ADC, de exemplu, care cuprinde o unitate de aminoacizi alternativă (de exemplu, Ala-Ala-Asn) sau o porțiune indivizibilă care poate fi scindată alternativă (de exemplu, o disulfură sau sulfonamidă care poate fi scindată).

Așa cum se descrie în acest document, unele dintre caracteristicile dorite sau toate caracteristicile dorite descrise mai sus pentru ADC-uri care cuprind un linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB care unește eribulina cu MORAb-003 pot fi observate cu ADC-uri care cuprind linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-eribulină-toxină conjugată la un anticorp anti-her2 cum ar fi trastuzumab, sau un anticorp anti-mezotelină.

Compușii ADC din prezenta descriere a invenției pot livra selectiv o doză eficientă dintr-un agent citotoxic sau citostatic către celulele canceroase sau către țesutul tumoral. S-a descoperit că ADC-urile făcute cunoscute au activitate citotoxică și/sau citostatică puternică împotriva celulelor care exprimă antigenul țintă respectiv (de exemplu, FRA sau her2). Așa cum se descrie în acest document, activitatea citotoxică și/sau citostatică a ADC-ului este dependentă de nivelul de exprimare al antigenului țintă într-o celulă. Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile făcute cunoscute sunt deosebit de eficiente în uciderea celulelor canceroase care exprimă un nivel

ridicat de antigen țintă, în comparație cu celulele canceroase care exprimă același antigen la un nivel scăzut. Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile făcute cunoscute sunt deosebit de eficiente în uciderea celulelor canceroase care exprimă antigenul țintă la un nivel moderat, în comparație cu celulele canceroase care exprimă același antigen la un nivel scăzut. Cancerile care exprimă FRA ridicat cu titlu de exemplu includ, dar nu sunt limitate la, cancer ovarian (de exemplu, cancer ovarian seros, cancer ovarian cu celule clare), carcinoid pulmonar, cancer mamar triplu negativ, cancer endometrial, și cancer pulmonar cu celule mici (de exemplu, adenocarcinom). Cancerile care exprimă FRA moderat cu titlu de exemplu includ, dar nu sunt limitate la, cancer gastric și cancer colorectal. Cancerile care exprimă FRA scăzut cu titlu de exemplu includ, dar nu sunt limitate la, melanom și limfom. Cancerile care exprimă her2 ridicat cu titlu de exemplu includ, dar nu sunt limitate la, cancer mamar, cancer gastric, cancer esofagian, cancer ovarian, și cancer endometrial. Cancerile care exprimă her2 moderat cu titlu de exemplu includ, dar nu sunt limitate la, cancer pulmonar și cancer de vezică urinară.

Așa cum se descrie în acest document, scindarea unui ADC eliberează eribulină din porțiunea indivizibilă de anticorp și linker. Așa cum se descrie în acest document, scindarea și eliberarea eribulinei îmbunătățesc citotoxicitatea ADC-ului. Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker care poate fi scindat este deosebit de eficient în uciderea celulelor canceroase, inclusiv uciderea vecinătăților, în comparație cu tratamentul comparabil cu un ADC care cuprinde un linker care nu poate fi scindat. Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker care poate fi scindat (de exemplu, un linker Val-Cit) demonstrează ucidere a celulelor la țintă crescută și/sau ucidere scăzută a celulelor departe de țintă în raport cu un ADC care cuprinde un linker care nu poate fi scindat (de exemplu, un linker care nu poate fi scindat (PEG)₂ sau (PEG)₄), în particular unde celulele și/sau cancerul tratat cu ADC-ul nu exprimă niveluri ridicate ale antigenului țintă.

Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile făcute cunoscute demonstrează, de asemenea, activitate de ucidere a vecinătăților, dar citotoxicitate scăzută departe de țintă. Fără a fi legat de teorie, activitatea de ucidere a vecinătăților a unui ADC poate fi deosebit de benefică în cazul în care penetrarea sa într-o tumoră solidă este limitată și/sau exprimarea antigenului țintă între celulele tumorale este heterogenă. Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker care poate fi scindat este deosebit de eficient în uciderea vecinătăților și/sau demonstrează o activitate de ucidere a vecinătăților îmbunătățită, în comparație cu tratamentul comparabil cu un ADC care cuprinde un linker care nu poate fi scindat.

În acest document sunt furnizați compuși ADC care cuprind un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia (Ab) care țintește o celulă tumorală, o porțiune indivizibilă de medicament (D), și o porțiune indivizibilă linker (L) care atașează covalent Ab la D. În anumite aspecte, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen este capabil să se lege la un antigen asociat tumorii (de exemplu, FRA sau her2) cu specificitate ridicată și afinitate ridicată. Așa cum se descrie în acest document, anticorpul sau fragmentul de legare la antigen este internalizat într-o celulă țintă la legare, de exemplu, într-un compartiment de degradare din celulă. ADC-urile preferate sunt, prin urmare, cele care se internalizează după legarea la o celulă țintă, suferă degradare, și eliberează porțiunea indivizibilă de medicament pentru a ucide celulele canceroase. Porțiunea indivizibilă de medicament poate fi eliberată din anticorp și/sau porțiunea indivizibilă linker a ADC-ului prin acțiune enzimatică, hidroliză, oxidare, sau orice alt mecanism.

Un ADC cu titlu de exemplu are Formula I:



în care Ab = porțiune indivizibilă de anticorp (adică anticorp sau fragment de legare la antigen), L = porțiune indivizibilă linker, D = porțiune indivizibilă de medicament, și p = numărul de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp.

Anticorpi

Porțiunea indivizibilă de anticorp (Ab) cu Formula I include în sfera sa orice anticorp sau fragment de legare la antigen care se leagă în mod specific la un antigen țintă pe o celulă canceroasă. Anticorpul sau fragmentul de legare la antigen se poate lega la un antigen țintă cu o constantă de disociere (K_D) de ≤ 1 mM, ≤ 100 nM sau ≤ 10 nM, sau orice cantitate între ele, măsurată prin, de exemplu, analiza BIAcore®. Așa cum se descrie în acest document, K_D este de 1 pM până la 500 pM. Așa cum se descrie în acest document, K_D este cuprinsă între 500 pM până la 1 μ M, 1 μ M până la 100 nM, sau 100 mM până la 10 nM.

Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp este un anticorp cu patru lanțuri (menționat, de asemenea, ca o imunoglobulină), care cuprinde două lanțuri grele și două lanțuri ușoare. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp este

un semicorp cu două lanțuri (un lanț ușor și un lanț greu), sau un fragment de legare la antigen al unei imunoglobuline.

Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp is an anticorp de internalizare sau fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia. Așa cum se descrie în acest document, anticorpul de internalizare se leagă la un antigen țintă de cancer exprimat pe suprafața unei celule și intră în celulă la legare. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de medicament a ADC-ului este eliberată din porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului după ce ADC intră și este prezent într-o celulă care exprimă antigenul țintă de cancer (adică după ce ADC a fost internalizat).

Secvențele de aminoacizi și de acid nucleic ale unor anticorpi cu titlu de exemplu din prezenta descriere a invenției sunt stabilite în Tabelele 1-9.

Tabelul 1. Anticorpi

mAb	Clasă/izotip	Țintă
MORAb-003	umanizat	receptorul alfa al folatului uman
MORAb-009	chimeric șoarece-uman	mezotelină umană
trastuzumab	umanizat	her2/neu uman
33011-xi	chimeric iepure-uman	mezotelină umană
33011-zu	umanizat	mezotelină umană
111B10-xi	chimeric iepure-uman	mezotelină umană
111B10-zu	umanizat	mezotelină umană
201C15-xi	chimeric iepure-uman	mezotelină umană
201C15-zu	umanizat	mezotelină umană
346C6-xi	chimeric iepure-uman	mezotelină umană
346C6-zu	umanizat	mezotelină umană
Abrevieri: xi - chimeric; zu - umanizat.		

Tabelul 2. Secvențele de aminoacizi ale regiunilor variabile ale mAb

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
1	MORAb-003	Lanț greu	23	EVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCSASGFT FSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSGGS YTTYADSVKGRFAISRDNKNTLFLQMD SLRPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYWGQG TPVTVSS
2	MORAb-003	Lanț ușor	24	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSS ISSNNLHWYQQKPKAPKPIYGTSLNLA SGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDT ATYYCQQWSSYPYMYTFGQGTKVEIK
3	MORAb-009	Lanț greu	25	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYS FTGYTMNWVKQSHGKSLIEWIGLITPYNG ASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLL SLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGS TPVTVSS
4	MORAb-009	Lanț ușor	26	DIELTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSS VSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASG VPGRFSGSGSGNSYSLTISVVEAEDDAT YYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIK

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
5	trastuzumab	Lanț greu	27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFN IKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNG YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ GTLVTVSS
6	trastuzumab	Lanț ușor	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQD VNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
7	33011-xi	Lanț greu	29	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGISL SSDAISWVRQAPGKLEYIGIINGGGNT YYASWAKGRFTISKSTTVDLKITSPTT EDTATYFCARGIQHGGGNSDYYYGMDL WGPGTLVTVSS
8	33011-xi	Lanț ușor	30	EVLMTQTPSSVSAAVGDTVTKQASQS ISSVLSWYQQKPGQPPLLIYLASTLAS GVPSRFSGSRSGTEFTLTISDLECDAA TYYCQTNYGTSSTSSNYGFAFGGGTEVVVK
9	33011-zu	Lanț greu	31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIS LSSDAISWVRQAPGKLEYIGIINGGGN TYYASWAKGRFTISRHNSKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARGIQHGGGNSDYYYG MDLWGQGTTLVTVSS
10	33011-zu	Lanț ușor	32	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQS ISSVLSWYQQKPGKAPKLLIYLASTLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQCEDIA TYYCQTNYGTSSTSSNYGFAFGGGTKVEIK
11	111B10-xi	Lanț greu	33	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSL NNYAMSWVRQAPGKLEWIGSISTGGLA FYANWAKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTT EDTATYFCGRNGGGSYIFYFDLWGQGT LTVTVSS
12	111B10-xi	Lanț ușor	34	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKQASQS ISSYLSWYQQKPGQPPLLIYSASTLAS GVSSRFKSGSGTEYTLTISDLECADAA TYFCQSYDIGTSTFGGGTEVVVK
13	111B10-zu	Lanț greu	35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS LNNYAMSWVRQAPGKLEWIGSISTGGL AFYANWAKGRFTISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARNGGGSYIFYFDLWG QGTLVTVSS
14	111B10-zu	Lanț ușor	36	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQS ISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYSASTLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQCEDAA TYYCQSYDIGTSTFGGGTKVEIK

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
15	201C15-xi	Lanț greu	37	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDL SSYAMGWFRQAPGKGLEYIGTINIGGRV YYASWAKGRFTISRTSTTVDLKAPSLTA EDTATYFCARYYNGGSYDIWGPGLVTV SL
16	201C15-xi	Lanț ușor	38	DVMTQTPASASEFPVGGTVTIKQASES IYRVLAWYQQKPGQPPLLIYDTSTLAS GAPSRFKSGSGYTEFTLTISGVQCEDAA TYYCQGGYYADSYGIAFGGGTEVVVK
17	201C15-zu	Lanț greu	39	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGID LSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGTINIGGR VYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARYYNGGSYDIWQGCTL VTVSS
18	201C15-zu	Lanț ușor	40	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCQASES IYRVLAWYQQKPGKAPKLLIYDTSTLAS GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQCDDAA TYYCQGGYYADSYGIAFGGGTKVEIK
19	346C6-xi	Lanț greu	41	QSVESGGRLVKPDESLTLTCTASGFSL SSYAMIWVRQAPGEGLEWIGTISTGGIT YYASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSPTT EDTATYFCARGGYAASSAYYLPYYFDLW GQCTLVTVSS
20	346C6-xi	Lanț ușor	42	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQS VYNNNNLAWFQQKPGQPPLLIYLASTL ASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDD AATYYCLGGCDDADTFAFGGGTEVVVK
21	346C6-zu	Lanț greu	43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS LSSYAMIWVRQAPGKGLEWIGTISTGGI TYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGGYAASSAYYLPYYF DLWGQCTLVTVSS
22	346C6-zu	Lanț ușor	44	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSQS VYNNNNLAWYQQKPGKVPKLLIYLASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQCED AATYYCLGGCDDADTFAFGGGTKVEIK

Tabelul 3. Secvențe de acid nucleic care codifică regiuni variabile ale mAb

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
1	MORAb-003	Lanț greu	45	GAGGTCCAACCTGGTGGAGAGCGGTGGAG GTGTTGTGCAACCTGGCCGGTCCCTGCCG CCTGTCCTGCTCCGCATCTGGCTTCACC TTCAGCGGCTATGGGTGTCTTGGGTGA GACAGGCACCTGGAAAAGGTCTTGAGTG GGTTGCAATGATTAGTAGTGGTGGTAGT TATACCTACTATGCAGACAGTGTGAAGG GTAGATTTGCAATATCGCGAGACAACGC CAAGAACACATTGTTCTGCAAATGGAC AGCCTGAGACCCGAAGACACCGGGGTCT ATTTTGTGCAAGACATGGGGACGATCC CGCCTGGTTCGCTTATTTGGGGCCAAGGG ACCCCGGTCACCGTCTCCTCA
2	MORAb-003	Lanț ușor	46	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCAAGCA GCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGT GACCATCACCTGTAGTGTGAGCTCAAGT ATAAGTTCCAACAACCTTGCACTGGTACC AGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCC ATGGATCTACGGCACATCCAACCTGGCT TCTGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTA GCGGTAGCGGTACCGACTACACCTTCAC CATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATC GCCACCTACTACTGCCAACAGTGGAGTA GTTACCCGTACATGTACACGTTCTGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
3	MORAb-009	Lanț greu	47	CAGGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCCTG AGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAA GATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCA TTCAGTGGCTACACCATGAACTGGGTGA AGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTG GATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGT GCTTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGG GCAAGGCCACATTAAGTGTAGACAAGTC ATCCAGCACAGCCTACATGGACCTCCTC AGTCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCT ATTTCTGTGCAAGGGGGGGTTACGACGG GAGGGGTTTTGACTACTGGGGATCCGGG ACCCCGGTCACCGTCTCCTCA

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
4	MORAb-009	Lanț ușor	48	GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAA TCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGT CACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGT GTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGA AGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGAT TTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGA GTCCCAGGTCCGCTTCAGTGGCAGTGGGT CTGGAAACTCTTACTCTCTCACAATCAG CAGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACT TATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACC CTCTCACGTTCCGATCCGGGACCAAGGT GGAAATCAAA
5	33011-xi	Lanț greu	49	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCCGCC TGGTCACGCCCTGGGACACCCCTGACACT CACCTGCACCGTCTCTGGAATCTCCCTC AGTAGCGATGCAATAAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTCGAATACAT CGGAATCATTAATGGTGGTGGTAACACA TACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGAT TCACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGT GGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACC GAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCA GAGGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAG TGATTATTATTATTACGGCATGGACCTC TGGGGCCCAGGCACCCCTGGTCACTGTCT CTTCA
6	33011-xi	Lanț ușor	50	GAAGTGTGATGACCCAGACTCCATCCT CCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGACACAGT CACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGC ATTAGTAGTGTCTTGTCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCT GATCTATCTGGCATCCACTCTGGCATCT GGGGTCCCATCCGGTTTCAGCGGCAGTA GATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCAT CAGCGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCC ACTTACTACTGTCAAACCAATTATGGTA CTAGTAGTAGTAATTATGGTTTGTCTTT CGGCGGAGGGACCGAGGTGGTCCGTCAA

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
7	33011-zu	Lanț greu	51	GAAGTCCAACTGGTGGAAAGCGGGGGAG GACTGGTGCAGCCGGGCGGATCCCTCCG GCTGTCATGTGCTGCATCGGGAATTTCC CTCTCCTCCGACGCGATTAGCTGGGTCA GACAGGCCCCCGAAAGGGGCTGGAGTA CATCGGTATCATCAACGGCGGCGGAAAC ACCTACTACGCCTCCTGGGCCAAGGGCC GCTTCACCATCTCGCGGCATAATTCCAA GAACACTCTGTACTTGCAAATGAACTCC CTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCGCGCGGCATCCAGCACGGTGG TGGAAACAGCGACTACTACTACTATGGG ATGGATCTGTGGGGCCAGGGAACTCTTG TGACCGTGTCGTCA
8	33011-zu	Lanț ușor	52	GACATTTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCT CGCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGGT GACCATCACGTGCCAGGCGTCCCAGTCA ATTAGCAGCGTGCTCTCCTGGTACCAAC AGAAGCCGGGGAAAGCACCCAAAGCTGCT GATCTACTTGGCCTCCACTCTGGCCTCG GGAGTGCCTTCACGGTTCTCCGGATCGG GATCTGGTACTGATTTACCCCTCACCAT CTCGAGCCTTCAGTGCGAGGACATCGCT ACTTACTATTGTCAAACCAACTACGGAA CCTCCAGCTCCAACCTACGGCTTTGCCTT CGGTGGCGGGACCAAGGTCGAAATCAAA
9	111B10-xi	Lanț greu	53	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCC TGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACT CACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTC AATAACTATGCAATGAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGAT CGGATCCATTAGTACTGGTGGTCTCGCA TTCTACGCGAACTGGGCAAAAGGCCGAT TCACCATCTCCAGAACCTCGACCACGGT GGATCTGAAAATGACCACTGTGACAACC GAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGGCA GAAATGGTGGTGGTAGTTATATTTCTA TTATTTTGACTTGTGGGGCCAAGGCACC CTCGTCACTGTCTCTTCA

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
10	111B10-xi	Lanț ușor	54	GCATTTCGAATTGACCCAGACTCCATCCT CCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAAT CACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGC ATTAGTAGTTACTTATCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCT GATCTATTCTGCATCCACTCTGGCATCT GGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTG GATCTGGGACAGAGTACACTCTCACCAT CAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCC ACTTACTTCTGTCAAAGCTATTATGATA TTGGTACTAGTACTTTCGGCGGAGGGAC CGAGGTGGTCTGTCAAA
11	111B10-zu	Lanț greu	55	GAAGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGCG GACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAG ACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCTCC CTGAACAACACGCCATGTCTGGGTGC GACAGGCCCCCTGGCAAAGGCTGGAATG GATCGGCTCCATCAGCACAGGCGGCCTG GCCTTCTACGCCAATTGGGCCAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACTCCAA GAACACCCTGTACCTCCAGATGAAGTCC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACT ACTGTGCCAGAAACGGCGGAGGCTCCTA CATCTTCTACTACTTCGACCTGTGGGGC CAGGGCACCCTCGTGACAGTGTCTATCT
12	111B10-zu	Lanț ușor	56	GATATTTCAGATGACCCAGTCCCCCTCCA GCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGAGT GACCATCACCTGTGAGGCCTCCAGTCC ATCTCCTCCTACCTGTCTGGTATCAGC AGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCT GATCTACTCTGCCTCCACACTGGCCTCC GGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCAT CAGCTCCCTCCAGTGCGAGGATGCCGCC ACCTACTACTGCCAGTCTTACTACGACA TCGGCACCTCCACCTTCGGCGGAGGCAC CAAGGTGGAAATCAAA

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
13	201C15-xi	Lanț greu	57	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGTCGCC TGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACT CACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTC AGTAGCTATGCAATGGGCTGGTTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACAT CGGAACCATTAATATTGGTGGTCGCGTA TATTACGCGAGCTGGGCAAAAGGCCGAT TCACCATCTCCAGAACCCTCGACCACGGT GGATCTGAAAGCGCCAGTCTGACAGCC GAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCA GATATTATAATGGTGGTAGTTATGACAT CTGGGGGCCAGGCACCCTGGTCACCGTC TCTTTA
14	201C15-xi	Lanț ușor	58	GATGTTGTGATGAACCAGACTCCAGCCT CCGCGTCTGAACCTGTGGGAGGCACAGT CACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGAGC ATTTATCGCGTATTGGCCTGGTATCAGC AGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCT GATCTATGATACATCCACTCTGGCATCT GGGGCCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTG GATATGGGACAGAGTTCACCTCTCACCAT CAGCGGCGTGCACTGTGAAGATGCTGCC ACTTACTACTGTCAAGGCGGTTATTATG CTGATAGTTATGGIATTGCTTTCGGCGG AGGGACCGAGGTGGTGGTCAA
15	201C15-zu	Lanț greu	59	CAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAG GACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAG ACTGTCCTGTTCGGCCTCCGGAATCGAC CTGTCCTCCTACGCTATGGGCTGGGTGC GACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTA CATCGGCACCATCAACATCGGCGGCAGA GTGTACTACGCTCCTGGGCCAAGGGCC GGTTCACCATCTCCAGAGACAACTCCAA GAACACCCTGTACCTCCAGATGAACTCC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCGCCCGGTACTACAACGGCGGCTC CTACGATATCTGGGGCCAGGGCACACTC GTGACCGTGTCTCT

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
16	201C15-zu	Lanț ușor	60	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCA CCCTGTCTGCCCTCTGTGGGCGACAGAGT GACCATCACCTGTCAGGCCTCCGAGTCC ATCTACCGGGTGCTGGCCTGGTATCAGC AGAAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCT GATCTACGACACCAGCACACTGGCCTCC GGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCAGAGTTTACCTGACCAT CTCCAGCCTCCAGTGCGACGACGCCGCC ACCTACTATTGTCAGGGCGGCTACTACG CCGACTCCTACGGAATCGCTTTCGGCGG AGGCACCAAGGTGGAAATCAAA
17	346C6-xi	Lanț greu	61	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCGGTGCGC TGGTAAAGCCTGACGAATCCCTGACACT CACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTC AGTAGTTATGCAATGATCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAATGGAT CGGAACCATTAGTACTGGTGGTATCACA TACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGAT TCACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGT GGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACC GAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCA GAGGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTA TTATCTCCCGTACTACTTTGACTTGTGG GGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCT CA
18	346C6-xi	Lanț ușor	62	GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATCAC CCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGT CACCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAGT GTTTATAATAATAACAACCTTAGCCTGGT TTCAGCAGAAACCCGGGCAGCCTCCCAA GCTTCTGATCTATCTGGCATCCACTCTG GCATCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCG GCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT CACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGAT GCTGCCACTTATTACTGTCTAGGTGGTT GTGATGATGATGCTGATACTTTTGCTTT CGGCCGAGGGACTGAGGTGGTGGTCAAA

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
19	346C6-zu	Lanț greu	63	GAAGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGCGGCG GACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAG ACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCTCC CTGTCTCTCTACGCTATGATCTGGGTGC GACAGGCCCTGGCAAGGGCTGGAATG GATCGGCACCATCTCTACGGCGGAATT ACCTACTACGCTCTCTGGGCAAGGGCC GGTTCACCATCTCCAGAGACAACCTCAA GAACACCTGTACCTCCAGATGAACCTC CTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACT ATTGTGCTAGAGCGGCTACGCGCCAG CTCCGCTTACTACCTGCCCTACTACTTC GACCTGTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGA CAGTGTCTCT
20	346C6-zu	Lanț ușor	64	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCCA GCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGAGT GACCATCACCTGTCAGTCTCCAGTCC GTGTATAACAACAACCTGGCCTGGT ATCAGCAGAAACCCGGCAAGGTGCCCAA GCTGCTGATCTACCTGGCCTCCACACTG GCCTCTGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCG GCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCT GACCATCAGCTCCCTCCAGTGGGAGGAT GCCGCCACCTACTATTGCCTGGGCGGCT GCGACGACGACGCCGATACCTTTGCTTT TGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAA

Tabelul 4. Secvențele de aminoacizi ale CDR-urilor Kabat ale mAb

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
1	MORAb-003	CDR1 HC	2	YGGLS
2	MORAb-003	CDR2 HC	3	MISSGGSYTYADSVKG
3	MORAb-003	CDR3 HC	4	HGDDPAWFAY
4	MORAb-003	CDR1 LC	7	SVSSISSNNLH
5	MORAb-003	CDR2 LC	8	GTSNLAS
6	MORAb-003	CDR3 LC	9	QQWSSYPMYT
7	MORAb-009	CDR1 HC	65	GYTMN
8	MORAb-009	CDR2 HC	66	LITPYNGASSYNQKFRG
9	MORAb-009	CDR3 HC	67	GGYDGRGFDY
10	MORAb-009	CDR1 LC	68	SASSVSYMH
11	MORAb-009	CDR2 LC	69	DTSKLAS
12	MORAb-009	CDR3 LC	70	QQWSKHPLT
13	trastuzumab	CDR1 HC	71	DTYIH
14	trastuzumab	CDR2 HC	72	RIYPTNGYTRYADSVKG
15	trastuzumab	CDR3 HC	73	WGGDGFYAMDY
16	trastuzumab	CDR1 LC	74	RASQDVNTAVA
17	trastuzumab	CDR2 LC	75	SASFLYS

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
18	trastuzumab	CDR3 LC	76	QQHYTTPPT
19	33011-xi	CDR1 HC	77	SDAIS
20	33011-xi	CDR2 HC	78	IINGGGNTYYASWAKG
21	33011-xi	CDR3 HC	79	GIQHGGGNSDYYYYGMDL
22	33011-xi	CDR1 LC	80	QASQSISSVLS
23	33011-xi	CDR2 LC	81	LASTLAS
24	33011-xi	CDR3 LC	82	QTNYGTSSSNYGFA
25	33011-zu	CDR1 HC	83	SDAIS
26	33011-zu	CDR2 HC	84	IINGGGNTYYASWAKG
27	33011-zu	CDR3 HC	85	GIQHGGGNSDYYYYGMDL
28	33011-zu	CDR1 LC	86	QASQSISSVLS
29	33011-zu	CDR2 LC	87	LASTLAS
30	33011-zu	CDR3 LC	88	QTNYGTSSSNYGFA
31	111B10-xi	CDR1 HC	89	NYAMS
32	111B10-xi	CDR2 HC	90	SISTGGLAFYANWAKG
33	111B10-xi	CDR3 HC	91	NGGGSYIFYFDL
34	111B10-xi	CDR1 LC	92	QASQSISSYLS
35	111B10-xi	CDR2 LC	93	SASTLAS
36	111B10-xi	CDR3 LC	94	QSYDIGTST
37	111B10-zu	CDR1 HC	95	NYAMS
38	111B10-zu	CDR2 HC	96	SISTGGLAFYANWAKG
39	111B10-zu	CDR3 HC	97	NGGGSYIFYFDL
40	111B10-zu	CDR1 LC	98	QASQSISSYLS
41	111B10-zu	CDR2 LC	99	SASTLAS
42	111B10-zu	CDR3 LC	100	QSYDIGTST
43	201C15-xi	CDR1 HC	101	SYAMG
44	201C15-xi	CDR2 HC	102	TINIGGRVYYASWAKG
45	201C15-xi	CDR3 HC	103	YYNGGSYDI
46	201C15-xi	CDR1 LC	104	QASESIYRVLA
47	201C15-xi	CDR2 LC	105	DTSTLAS
48	201C15-xi	CDR3 LC	106	QGGYYADSYGIA
49	201C15-zu	CDR1 HC	107	SYAMG
50	201C15-zu	CDR2 HC	108	TINIGGRVYYASWAKG
51	201C15-zu	CDR3 HC	109	YYNGGSYDI
52	201C15-zu	CDR1 LC	110	QASESIYRVLA
53	201C15-zu	CDR2 LC	111	DTSTLAS
54	201C15-zu	CDR3 LC	112	QGGYYADSYGIA
55	346C6-xi	CDR1 HC	113	SYAMI
56	346C6-xi	CDR2 HC	114	TISTGGITYYASWAKG
57	346C6-xi	CDR3 HC	115	GGYAASSAYYLPYYFDL
58	346C6-xi	CDR1 LC	116	QSSQSVYNNNNLA
59	346C6-xi	CDR2 LC	117	LASTLAS
60	346C6-xi	CDR3 LC	118	LGGCDDDADTFA
61	346C6-zu	CDR1 HC	119	SYAMI

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
62	346C6-zu	CDR2 HC	120	TISTGGITYYASWAKG
63	346C6-zu	CDR3 HC	121	GGYAASSAYYLPYYFDL
64	346C6-zu	CDR1 LC	122	QSSQSVYNNNNLA
65	346C6-zu	CDR2 LC	123	LASTLAS
66	346C6-zu	CDR3 LC	124	LGGCDDADTFA

Tabelul 5. Secvențele de aminoacizi care codifică CDR-urile Kabat ale mAb

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
1	MORAb-003	CDR1 HC	125	GGCTATGGGTTGTCT
2	MORAb-003	CDR2 HC	126	ATGATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACCTACTATG CAGACAGTGTGAACGGT
3	MORAb-003	CDR3 HC	127	CATGGGGACGATCCCGCCTGGTTTCGCTT AT
4	MORAb-003	CDR1 LC	128	AGTGTCAAGCTCAAGTATAAGTTCCAACAACCTTGC AC
5	MORAb-003	CDR2 LC	129	GGCACATCCAACCTGGCTTCT
6	MORAb-003	CDR3 LC	130	CAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACATG TACACG
7	MORAb-009	CDR1 HC	131	GGCTACACCATGAAC
8	MORAb-009	CDR2 HC	132	CTTATTACTCCTTACAATGGTGGTCTTAGCTACA ACCAGAAGTTCAGGGGC
9	MORAb-009	CDR3 HC	133	GGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTGAC TAC
10	MORAb-009	CDR1 LC	134	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATG CAC
11	MORAb-009	CDR2 LC	135	GACACATCCAAACTGGCTTCT
12	MORAb-009	CDR3 LC	136	CAGCAGTGGAGTAAGCACCCCTCTCACG
13	33011-xi	CDR1 HC	137	AGCGATGCAATAAGC
14	33011-xi	CDR2 HC	138	ATCATTAATGGTGGTGGTAACACATACTACGCGA GCTGGGCGAAAGGC
15	33011-xi	CDR3 HC	139	GGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGTGATTATT ATTATTACGGCATGGACCTC
16	33011-xi	CDR1 LC	140	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTGTC TTGTCC
17	33011-xi	CDR2 LC	141	CTGGCATCCACTCTGGCATCT
18	33011-xi	CDR3 LC	142	CAAACCAATTATGGTACTAGTAGTAGTAATTATG GTTTGTCT
19	33011-zu	CDR1 HC	143	TCCGACGCGATTAGC
20	33011-zu	CDR2 HC	144	ATCATCAACGGCGCGGAAACACCTACTACGCCT CCTGGGCCAAGGGC
21	33011-zu	CDR3 HC	145	GGCATCCAGCACGGTGGTGGAAACAGCGACTACT ACTACTATGGGATGGATCTG
22	33011-zu	CDR1 LC	146	CAGGCGTCCCAGTCAATTAGCAGCGTG CTCTCC
23	33011-zu	CDR2 LC	147	TTGGCCTCCACTCTGGCCTCG
24	33011-zu	CDR3 LC	148	CAAACCAACTACGGAACCTCCAGCTCCAACCTACG GCTTTGCC
25	111B10-xi	CDR1 HC	149	AACTAT GCAAT GAGC

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
26	111B10-xi	CDR2 HC	150	TCCATTAGTACTGGTGGTCTCGCATTCTACGCGA ACTGGGCAAAAGGC
27	111B10-xi	CDR3 HC	151	AATGGTGGTGGTAGTTATATTTTCTATTATTTTG ACTTG
28	111B10-xi	CDR1 LC	152	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTTAC TTATCC
29	111B10-xi	CDR2 LC	153	TCTGCATCCACTCTGGCATCT
30	111B10-xi	CDR3 LC	154	CAAAGCTATTATGATATTGGTACTAGTA CT
31	111B10-zu	CDR1 HC	155	AACTACGCCATGTCC
32	111B10-zu	CDR2 HC	156	TCCATCAGCACAGGCGGCCTGGCCTTCTACGCCA ATTGGGCCAAGGGC
33	111B10-zu	CDR3 HC	157	AACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTACTACTTCG ACCTG
34	111B10-zu	CDR1 LC	158	CAGGCCTCCCAGTCCATCTCCTCCTACC TGTCC
35	111B10-zu	CDR2 LC	159	TCTGCCTCCACACTGGCCTCC
36	111B10-zu	CDR3 LC	160	CAGTCCTACTACGACATCGGCACCTCCA CC
37	201C15-xi	CDR1 HC	161	AGCTATGCAATGGGC
38	201C15-xi	CDR2 HC	162	ACCATTAATATTGGTGGTTCGCGTATATTACGCGA GCTGGGCAAAAGGC
39	201C15-xi	CDR3 HC	163	TATTATAATGGTGGTAGTTATGACATC
40	201C15-xi	CDR1 LC	164	CAGGCCAGTGAGAGCATTTATCGCGTA TTGGCC
41	201C15-xi	CDR2 LC	165	GATACATCCACTCTGGCATCT
42	201C15-xi	CDR3 LC	166	CAAGGCGGTTATTATGCTGATAGTTATGGTATTG CT
43	201C15-zu	CDR1 HC	167	TCCTACGCTATGGGC
44	201C15-zu	CDR2 HC	168	ACCATCAACATCGGCGGCAGAGTGTACTACGCCT CCTGGGCCAAGGGC
45	201C15-zu	CDR3 HC	169	TACTACAACGGCGGCTCCTACGATATC
46	201C15-zu	CDR1 LC	170	CAGGCCTCCGAGTCCATCTACCGGGTG CTGGCC
47	201C15-zu	CDR2 LC	171	GACACCAGCACACTGGCCTCC
48	201C15-zu	CDR3 LC	172	CAGGGCGGCTACTACGCCGACTCCTACGGAATCG CT
49	346C6-xi	CDR1 HC	173	AGTTATGCAATGATC
50	346C6-xi	CDR2 HC	174	ACCATTAGTACTGGTGGTATCACATACTACGCGA GCTGGGCGAAAGGC
51	346C6-xi	CDR3 HC	175	GGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTATTATCTCC CGTACTACTTTGACTTG
52	346C6-xi	CDR1 LC	176	CAGTCCTCCCAGTCCGTGTATAACAACAACAACC TGGCC
53	346C6-xi	CDR2 LC	177	CTGGCATCCACTCTGGCATCT
54	346C6-xi	CDR3 LC	178	CTAGGTGGTTGTGATGATGATGCTGATACTTTTG CT
55	346C6-zu	CDR1 HC	179	TCCTACGCTATGATC

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
56	346C6-zu	CDR2 HC	180	ACCATCTCTACCGGCGGAATTACCTACTACGCCT CCTGGGCCAAGGGC
57	346C6-zu	CDR3 HC	181	GGCGGCTACGCCGCCAGCTCCGCTTACTACCTGC CCTACTACTTCGACCTG
58	346C6-zu	CDR1 LC	182	CAGTCCTCCCAGTCCGTGTATAACAACAACAACC TGGCC
59	346C6-zu	CDR2 LC	183	CTGGCCTCCACACTGGCCTCT
60	346C6-zu	CDR3 LC	184	CTGGGCGGCTGCGACGACGACGCCGATACCTTTG CT

Tabelul 6. Secvențele de aminoacizi ale CDR-urilor IMGT ale mAb

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
1	MORAb-003	CDR1 HC	13	GFTFSGYG
2	MORAb-003	CDR2 HC	14	ISSGGSYT
3	MORAb-003	CDR3 HC	15	ARHGDDPAWFAY
4	MORAb-003	CDR1 LC	16	SSISSNN
5	MORAb-003	CDR2 LC	17	GTS
6	MORAb-003	CDR3 LC	18	QQWSSYPMYT
7	MORAb-009	CDR1 HC	185	GYSFTGYT
8	MORAb-009	CDR2 HC	186	ITPYNGAS
9	MORAb-009	CDR3 HC	187	ARGGYDGRGFDY
10	MORAb-009	CDR1 LC	188	SSVSY
11	MORAb-009	CDR2 LC	189	DTS
12	MORAb-009	CDR3 LC	190	QQWSKHPLT
13	trastuzumab	CDR1 HC	191	GFNIKDTY
14	trastuzumab	CDR2 HC	192	IYPTNGYT
15	trastuzumab	CDR3 HC	193	SRWGDDGFYAMDY
16	trastuzumab	CDR1 LC	194	QDVNTA
17	trastuzumab	CDR2 LC	195	SAS
18	trastuzumab	CDR3 LC	196	QQHYTTPPT
19	33011-xi	CDR1 HC	197	GISLSSDA
20	33011-xi	CDR2 HC	198	INGGGNT
21	33011-xi	CDR3 HC	199	ARGIQHGGGNSDYYYGMDL
22	33011-xi	CDR1 LC	200	QSISSV
23	33011-xi	CDR2 LC	201	LAS
24	33011-xi	CDR3 LC	202	QTNYGTSSSNYGFA
25	33011-zu	CDR1 HC	203	GISLSSDA
26	33011-zu	CDR2 HC	204	INGGGNT
27	33011-zu	CDR3 HC	205	ARGIQHGGGNSDYYYGMDL
28	33011-zu	CDR1 LC	206	QSISSV
29	33011-zu	CDR2 LC	207	LAS
30	33011-zu	CDR3 LC	208	QTNYGTSSSNYGFA
31	111B10-xi	CDR1 HC	209	GFSLNNYA
32	111B10-xi	CDR2 HC	210	ISTGGLA
33	111B10-xi	CDR3 HC	211	GRNGGGSYIFYFDL

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
34	111B10-xi	CDR1 LC	212	QSISSY
35	111B10-xi	CDR2 LC	213	SAS
36	111B10-xi	CDR3 LC	214	QSYDIGTST
37	111B10-zu	CDR1 HC	215	GFSLNNYA
38	111B10-zu	CDR2 HC	216	ISTGGLA
39	111B10-zu	CDR3 HC	217	ARNGGGSYIFYFDL
40	111B10-zu	CDR1 LC	218	QSISSY
41	111B10-zu	CDR2 LC	219	SAS
42	111B10-zu	CDR3 LC	220	QSYDIGTST
43	201C15-xi	CDR1 HC	221	GIDLSSYA
44	201C15-xi	CDR2 HC	222	INIGGRV
45	201C15-xi	CDR3 HC	223	ARYYNGGSYDI
46	201C15-xi	CDR1 LC	224	ESIYRV
47	201C15-xi	CDR2 LC	225	DTS
48	201C15-xi	CDR3 LC	226	QGGYYADSYGIA
49	201C15-zu	CDR1 HC	227	GIDLSSYA
50	201C15-zu	CDR2 HC	228	INIGGRV
51	201C15-zu	CDR3 HC	229	ARYYNGGSYDI
52	201C15-zu	CDR1 LC	230	ESIYRV
53	201C15-zu	CDR2 LC	231	DTS
54	201C15-zu	CDR3 LC	232	QGGYYADSYGIA
55	346C6-xi	CDR1 HC	233	GFSLSSYA
56	346C6-xi	CDR2 HC	234	ISTGGIT
57	346C6-xi	CDR3 HC	235	ARGGYAASSAYLPYYFDL
58	346C6-xi	CDR1 LC	236	QSVYNNNN
59	346C6-xi	CDR2 LC	237	LAS
60	346C6-xi	CDR3 LC	238	LGGCDDADTFA
61	346C6-zu	CDR1 HC	239	GFSLSSYA
62	346C6-zu	CDR2 HC	240	ISTGGIT
63	346C6-zu	CDR3 HC	241	ARGGYAASSAYLPYYFDL
64	346C6-zu	CDR1 LC	242	QSVYNNNN
65	346C6-zu	CDR2 LC	243	LAS
66	346C6-zu	CDR3 LC	244	LGGCDDADTFA

Tabelul 7. Secvențele de aminoacizi care codifică CDR-urile IMGT ale mAb

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
1	MORAb-003	CDR1 HC	245	GGCTTCACCTTCAGCGGCTATGGG
2	MORAb-003	CDR2 HC	246	ATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACC
3	MORAb-003	CDR3 HC	247	GCAAGACATGGGGACGATCCCGCTGGTTCGCT TAT
4	MORAb-003	CDR1 LC	248	TCAAGTATAAGTTCCAACAAC
5	MORAb-003	CDR2 LC	249	GGCACATCC
6	MORAb-003	CDR3 LC	250	CAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACATG TACACG

	mAb	Laņ IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
7	MORAb-009	CDR1 HC	251	GGTTACTCATTCACTGGCTACACC
8	MORAb-009	CDR2 HC	252	ATTACTCCTTACAATGGTGCTTCT
9	MORAb-009	CDR3 HC	253	GCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTGTGAC TAC
10	MORAb-009	CDR1 LC	254	TCAAGTGTAAGTTAC
11	MORAb-009	CDR2 LC	255	GACACATCC
12	MORAb-009	CDR3 LC	256	CAGCAGTGGAGTAAGCACCTCTCACG
13	33011-xi	CDR1 HC	257	GGAATCTCCCTCAGTAGCGATGCA
14	33011-xi	CDR2 HC	258	ATTAATGGTGGTGGTAACACA
15	33011-xi	CDR3 HC	259	GCCAGAGGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGT GATTATTATTATTACGGCATGGACCTC
16	33011-xi	CDR1 LC	260	CAGAGCATTAGTAGTGTC
17	33011-xi	CDR2 LC	261	CTGGCATCT
18	33011-xi	CDR3 LC	262	CAAACCAATTATGGTACTAGTAGTAGTAATTAT GGTTTGTCT
19	33011-zu	CDR1 HC	263	GGAATTTCCCTCTCCTCCGACGCG
20	33011-zu	CDR2 HC	264	ATCAACGGCGGCGGAAACACC
21	33011-zu	CDR3 HC	265	GCGCGGGCATCCAGCACGGTGGTGGAAACAGC GACTACTACTACTATGGGATGGATCTG
22	33011-zu	CDR1 LC	266	CAGTCAATTAGCAGCGTG
23	33011-zu	CDR2 LC	267	TTGGCCTCC
24	33011-zu	CDR3 LC	268	CAAACCAACTACGGAACCTCCAGCTCCAACCTAC GGCTTTGCC
25	111B10-xi	CDR1 HC	269	GGATTCTCCCTCAATAACTATGCA
26	111B10-xi	CDR2 HC	270	ATTAGTACTGGTGGTCTCGCA
27	111B10-xi	CDR3 HC	271	GGCAGAAATGGTGGTGGTAGTTATATTTTCTAT TATTTTGACTTG
28	111B10-xi	CDR1 LC	272	CAGAGCATTAGTAGTTAC
29	111B10-xi	CDR2 LC	273	TCTGCATCC
30	111B10-xi	CDR3 LC	274	CAAAGCTATTATGATATTGGTACTAGT ACT
31	111B10-zu	CDR1 HC	275	GGCTTCTCCCTGAACAACCTACGCC
32	111B10-zu	CDR2 HC	276	ATCAGCACAGGCGGCCTGGCC
33	111B10-zu	CDR3 HC	277	GCCAGAAACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTAC TACTTCGACCTG
34	111B10-zu	CDR1 LC	278	CAGTCCATCTCCTCCTAC
35	111B10-zu	CDR2 LC	279	TCTGCCTCC
36	111B10-zu	CDR3 LC	300	CAGTCCTACTACGACATCGGCACCTCC ACC
37	201C15-xi	CDR1 HC	301	GGAATCGACCTCAGTAGCTATGCA
38	201C15-xi	CDR2 HC	302	ATTAATATTGGTGGTCTCGGTA
39	201C15-xi	CDR3 HC	303	GCCAGATATTATAATGGTGGTAGTTAT GACATC
40	201C15-xi	CDR1 LC	304	GAGAGCATTTATCGCGTA
41	201C15-xi	CDR2 LC	305	GATACATCC

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
42	201C15-xi	CDR3 LC	306	CAAGGCGGTTATTATGCTGATAGTTATGGTATT GCT
43	201C15-zu	CDR1 HC	307	GGAATCGACCTGTCCTCCTACGCT
44	201C15-zu	CDR2 HC	308	ATCAACATCGGCGGCAGAGTG
45	201C15-zu	CDR3 HC	309	GCCCGGTACTACAACGGCGGCTCCTAC GATATC
46	201C15-zu	CDR1 LC	310	GAGTCCATCTACCGGGTG
47	201C15-zu	CDR2 LC	311	GACACCAGC
48	201C15-zu	CDR3 LC	312	CAGGGCGGCTACTACGCCGACTCTACGGAATC GCT
49	346C6-xi	CDR1 HC	313	GGATTCTCCCTCAGTAGTTATGCA
50	346C6-xi	CDR2 HC	314	ATTAGTACTGGTGGTATCACA
51	346C6-xi	CDR3 HC	315	GCCAGAGGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTAT TATCTCCCGTACTACTTTGACTTG
52	346C6-xi	CDR1 LC	316	CAGAGTGTTTATAATAATAACAAC
53	346C6-xi	CDR2 LC	317	CTGGCATCC
54	346C6-xi	CDR3 LC	318	CTAGGTGGTTGTGATGATGATGCTGATACTTTT GCT
55	346C6-zu	CDR1 HC	319	GGCTTCTCCCTGTCCTCCTACGCT
56	346C6-zu	CDR2 HC	320	ATCTCTACCGGCGGAATTACC
57	346C6-zu	CDR3 HC	321	GCTAGAGGCGGCTACGCCGCCAGCTCCGCTTAC TACCTGCCCTACTACTTCGACCTG
58	346C6-zu	CDR1 LC	322	CAGTCCGTGTATAACAACAACAAC
59	346C6-zu	CDR2 LC	323	CTGGCCTCC
60	346C6-zu	CDR3 LC	324	CTGGGCGGCTGCGACGACGACGCCGATACCTTT GCT

Tabelul 8. Secvențele de aminoacizi ale lanțurilor Ig mAb de lungime completă

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
1	MORAb-003	Lanț greu	1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGY GLSWVRQAPGKLEWVAMISGGSYTYADSV KGRFAISRDNKNTLFLQMDSLRPEDTGYYFC ARHGDDPAWFAYWGQGPVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPFSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
2	MORAb-003	Lanț ușor	6	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSVSSSISN NLHWYQQKPGKAPKPKWIYGTSNLASGVPSRFS GSGSGTDYFTFTISSLQPEDATYYCQQWSSYP YMYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
3	MORAb-009	Lanț greu	325	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGY TMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKF RGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFC ARGGYDGRGFDYWGSGTPVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPFSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
4	MORAb-009	Lanț ușor	326	DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYM HWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPRFSGS GSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLT FGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5	trastuzumab	Lanț greu	327	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT YIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
6	trastuzumab	Lanț ușor	328	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFVSGVPSRFSG SRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPF TFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
7	33011-xi	Lanț greu	329	QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGISLSSDA ISWVRQAPGKGLYIGIINGGGNTYYASWAKG RFTISKSTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARGI QHGGGNSDYGGMDL WGPGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	33011-xi	Lanț ușor	330	EVLMTQTPSSVSAAGDVTIKCQASQSISSV LSWYQQKPGQPPLLIYLASTLASGVPSRFSG SRSGTEFTLTISDLECDAAATYYCQTNYGTS SNYGFAFGGGTEVTVKRTVAAPSVEIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
9	33011-zu	Lanț greu	331	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGISLSSD AISWVRQAPGKGLYIGIINGGGNTYYASWAK GRTISRHNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGIQHGGGNSDYGGMDLWGQGTTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKE KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
10	33011-zu	Lanț ușor	332	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSV LSWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSSLQCEDIATYYCQINYGTSS SNYGFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
11	111B10-xi	Lanț greu	333	QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLNNYA MSWVRQAPGKGLEWIGSISTGGLAFYANWAKG RFTISRTSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCGRNG GGSYIFYYFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	111B10-xi	Lanț ușor	334	AFELTQTSPSSVEAAVGGTITIKCQASQSISSY LSWYQQKPGQPPKLLIYSASTLASGVSSRFKG SGSGTEYTLTISDLECAATYFCQSYDIGT STFGGGTEVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	111B10-zu	Lanț greu	335	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNYY AMSWVRQAPGKGLEWIGSISTGGLAFYANWAK GRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RNGGGSYIFYYFDLWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
14	111B10-zu	Lanț ușor	336	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSY LSWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQCEDAATYYCQSYDIGT STFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
15	201C15-xi	Lanț greu	337	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYA MGWFRQAPGKGLLEYIGTINIGGRVYYASWAKG RFTISRTSTTVDLKAPSLTAEDTATYFCARYY NGGSYDIWGPGTLVTVSLASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	201C15-xi	Lanț ușor	338	DVMTQT PASASEPVGGTVTIKCQASESTYRV LAWYQQKPGQPPKLLIYDTSTLASGAPSRFKG SGYGTEFTLTISGVQCEDAATYYCQGGYYADS YGLAFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	201C15-zu	Lanț greu	339	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGIDLSSY AMGWVRQAPGKGLLEYIGTINIGGRVYYASWAK GRETISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RYYNGGSYDIWGQGT LTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPFCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
18	201C15-zu	Lanț ușor	340	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCQASESIYRV LAWYQQKPGKAPKLLIYDTSTLASGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQCDDAATYYCQGGYYADS YGIAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
19	346C6-xi	Lanț greu	341	QSVESGGRLVKPDESLLTCTASGFSLSYYA MIWVRQAPGEGLEWIGTISTGGITYYASWAKG RFTISKSTSTVDLKITSPTTEDTATYFCARGG YAASSAYYLPYYFDLWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK
20	346C6-xi	Lanț ușor	342	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYNN NNLAWFQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRF SGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGGCDD DADTFAGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
21	346C6-zu	Lanț greu	343	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSY AMIWVRQAPGKLEWIGTISTGGITYYASWAK GRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGYAASSAYYLPYYFDLWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKS LSLSPGK

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de aminoacizi
22	346C6-zu	Lanț ușor	344	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQSSQSVYNN NNLAWYQQKPGKVPKLLIYLASTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQCEDAATYYCLGGCDD DADTFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Tabelul 9. Secvențele de acid nucleic care codifică lanțuri Ig mAb de lungime completă⁺

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
1	MORAb-003	Lanț greu	345	GAGGTCCAACTGGTGGAGAGCGGTGGAGGTGT GTGCAACCTGGCCGGTCCCTGCGCCTGTCTGC TCCGCATCTGGCTTCACCTTCAGCGGCTATGGG TTGTCTTGGGTGAGACAGGCACCTGGAAAAGGT CTTGAGTGGGTGCAATGATTAGTAGTGGTGGT AGTTATACCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGT AGATTTGCAATATCGCGAGACAACGCCAAGAAC ACATTGTTCTCGCAAATGGACAGCCTGAGACCC GAAGACACCGGGGTCTATTTTGTGCAAGACAT GGGGACGATCCCGCCTGGTTCGCTTATTGGGGC CAAGGGACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA CCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTG ACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTA CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACG

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC TTATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA
2	MORAb-003	Lanț ușor	346	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCACC TGTAAGTGTGAGCTCAAGTATAAGTTCCAACAAC TTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCT CCAAAGCCATGGATCTACGGCACATCCAACCTG GCTTCTGGTGTGCCAAGCAGATTGAGCGGTAGC GCTAGCGGTACCGACTACACCTTCACCATCAGC AGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTAC TGCCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACATGTAC ACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAA
3	MORAb-009	Lanț greu	347	CAGGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTG GAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCTGC AAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACC ATGAAGTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGC CTTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAAT GGTGCTTCTAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGC AAGGCCACATTAAGTGTAGACAAGTCATCCAGC ACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCT GAAGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGGGGG GGTTACGACGGGAGGGGTTTTGACTACTGGGGA TCCGGGACCCCGGTACCGTCTCCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				CCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTA CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCCTAAACCAAGGACACCCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTG AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCTTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA
4	MORAb-009	Lanț ușor	348	GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATG TCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACC TGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCAC TGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAA AGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCT GGAGTCCCAGGTGCTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGAAACTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCGTG GAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAG CAGTGGAGTAAGCACCTCTCACGTTCCGATCC GCGACCAAGGTGCAATCAAACGAACTGTGGCT GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC ACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA CACAAAGTCTACGCCCTGCCAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTAA
5	33011-xi	Lanț greu	349	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTC ACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACC GTCTCTGGAATCTCCCTCAGTAGCGATGCAATA AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTC GAATACATCGGAATCATTAATGGTGGTGGTAAC ACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTC ACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTG AAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCC ACCTATTTCTGTGCCAGAGGCATTCAACATGGT GGTGGTAATAGTGATTATTTATTTACGGCATG GACCTCTGGGGCCCAGGCACCTGGTCACTGTC TCTTCAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTC CCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCC AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCCAGAAAACC

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC GCGAAATGA
6	33011-xi	Lanț ușor	350	GAAGTGTGATGACCCAGACTCCATCCTCCGTG TCTGCAGCTGTGGGAGACACAGTCACCATCAAG TGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTGTCTTG TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCC AAGCTCCTGATCTATCTGGCATCCACTCTGGCA TCTGGGGTCCCATCGCGGTTGAGCCGCAGTAGA TCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGAC CTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGT CAAACCAATTATGGTACTAGTAGTAGTAATTAT GCTTTTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTC GTCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TCGGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA
7	33011-zu	Lanț greu	351	GAAGTCCAACTGCTGGAAAGCGGGGGAGGACTG GTGCAGCCGGGCGGATCCCTCCGGCTGTCATGT GCTGCATCGGGAATTTCCCTCTCCTCCGACGGG ATTAGCTGGGTGAGACAGGCCCCCGGAAAGGGG CTGGAGTACATCGGTATCATCAACGGCGGCGGA AACACCTACTACGCCCTCCTGGGCCAAGGGCCGC TTCACCATCTCGCGGCATAATTCCAAGAACACT CTGTACTTGCAAATGAACTCCCTGAGGGCCGAG

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				GACACCGCCGTGTACTACTGCGCGCGCGGCATC CAGCACGGTGGTGGAAACAGCGACTACTACTAC TATGGGATGGATCTGTGGGGCCAGGGAACCTT GTGACCGTGTCTGTCAGCATCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCCGAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGGGAATGA
8	33011-zu	Lanț ușor	352	GACATTGAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCGCTG TCCGCCTCCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACG TGCCAGGCGTCCCAGTCAATTAGCAGCGTGCTC TCCTGGTACCAACAGAAGCCGGGGAAAGCACCC AAGCTGCTGATCTACTTGGCCTCCACTCTGGCC

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				TCGGGAGTGCCTTCACGGTTCTCCGGATCGGGA TCTGGTACTGATTTACCCCTCACCATCTCGAGC CTTCAGTGCGAGGACATCGCTACTTACTATTGT CAAACCAACTACGGAACTCCAGCTCCAACCTAC GGCTTTGCCTTCGGTGGCGGGACCAAGSTCGAA ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TCGGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA
9	111B10-xi	Lanț greu	353	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGTGCCTGGTC ACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACA GTCTCTGGATTCTCCCTCAATAACTATGCAATG AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAATGGATCGGATCCATTAGTACTGGTGGTCTC GCATTCTACGCCAACTGGGCAAAAGGCCGATTC ACCATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTG AAAATGACCACTCTGACAACCGAGGACACGGCC ACCTATTTCTGTGGCAGAAATGGTGGTGGTAGT TATATTTTCTATTATTTTGAATTGTGGGGCCAA GGCACCCCTCGTCACTGTCTCTTCAGCATCCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA GCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTA TATTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA
10	111B10-xi	Lanț ușor	354	GCATTGGAATTGACCCAGACTCCATCCTCCGTG GAGGCAGCTGTGGGAGGCACAATCACCATCAAG TGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTTACTTA TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCC AAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCACTCTGGCA TCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGGA TCTGGGACAGAGTACACTCTCACCATCAGCGAC CTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTTCTGT CAAAGCTATTATGATATTGGTACTAGTACTTTC GGCGGAGGGACCGAGGTGGTCTGTCAAACGAACT GTGGCTGCACCACTCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC AGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTGA
11	111B10-zu	Lanț greu	355	GAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTG GTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGT

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				GCGGCCTCCGGCTTCTCCCTGAACAACACTACGCC ATGTCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAAGGC CTGGAATGGATCGGCTCCATCAGCACAGGCGGC CTGGCCTTCTACGCCAATTGGGCCAAGGGCCGG TTCACCATCAGCCGGGACAACCTCCAAGAACACC CTGTACCTCCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAACGGC GGAGGCTCCTACATCTTCTACTACTTCGACCTG TGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCTCT GCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC GCCCTGACCAGCGGGTGCACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG TCAGTCTTCTCTTCCCCCAGAAACCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCTGACCAGGACTGGGTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG ACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGA TGA

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
12	111B10-zu	Lanț ușor	356	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTG TCCGCTTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCAGGCCTCCCAGTCCATCTCCTCCTACCTG TCCTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACTCTGCCTCCACACTGGCC TCCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGC TCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCC CTCCAGTGCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGC CAGTCCTACTACGACATCGGCACCTCCACCTTC GGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAACGAACT GTGGCTGCACCACTCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACACA GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTGA
13	201C15-xi	Lanț greu	357	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTC ACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACA GTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGCAATG GGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAATACATCGGAACCATTAATATTGGTGGTCGC GTATATTACGCGAGCTGGGCAAAAGGCCGATTC ACCATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTG AAAGCGCCAGTCTGACAGCCGAGGACACGGCC ACCTATTTCTGTGCCAGATATTATAATGGTGGT AGTTATGACATCTGGGGCCAGGCACCCCTGGTC ACCGTCTCTTTAGCATCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGSGTGTGG TGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTCTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTC CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTTCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCTTCACCGTCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCCGGGAATGA
14	201C15-xi	Lanț ușor	358	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTCCGCG TCTGAACCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAG TGCCAGGCCAGTGAGAGCATTATCGCGTATTG GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCC AAGCTCCTGATCTATGATACATCCACTCTGGCA TCTGGGGCCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGA TATGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGGC GTGCAGTGTGAAGATGCTGCCACTTACTACTGT CAAGGCGGTTATTATGCTGATAGTTATGGTATT GCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
15	201C15-zu	Lanț greu	359	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGCGGAGGACTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTCTGT TCCGCCCTCCGGAATCGACCTGTCTCTCTACGCT ATGGGCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGC CTGGAGTACATCGGCACCATCAACATCGGCGGC AGAGTGTAATAAGCCTCCTGGGCCAAGGGCCGG TTCACCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACC CTGTACCTCCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACTAC AACGGCGGCTCCTACGATATCTGGGGCCAGGGC ACACTCGTGACCGTGTCTCTGCATCCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCTGTGGAACCTCAGCGCCCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTCTACAGTCC TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCA CCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTC TTCCCCCAGAAACCAAGGACACCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATAT TCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
16	201C15-zu	Lanț ușor	360	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCCTG TCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCAGGCCTCCGAGTCCATCTACCGGCTGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACACCAGCACACTGGCC TCCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGC TCTGGCACCGAGTTTACCCTGACCATCTCCAGC CTCCAGTGCGACGACGCCGCCACCTACTATTGT CAGGGCGGCTACTACGCCGACTCCTACGGAATC GCTTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGAT AAGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA
17	346C6-xi	Lanț greu	361	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCGGTGCGCTGGTA AAGCCTGACGAATCCCTGACACTCACCCTGCACA GCCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTTATGCAATG ATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAGGGGCTG GAATGGATCGGAACCATTAGTACTGCTGGTATC ACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTC ACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTG AAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCC ACCTATTTCTGTGCCAGAGGGGGATATGCTGCT AGTAGTGCTTATTATCTCCCGTACTACTTTGAC TTGTGGGGCCAAGGGACCCCTGGTCACCGTCTCC TCAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				ACAGCGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCG GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGA CCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAG GACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGG AAATGA
18	346C6-xi	Lanț ușor	362	GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATCACCCGTG TCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAGT TGCCAGTCCAGTCAGACTGTTTATAATAATAAC AACTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCCGGGCAG CCTCCCAAGCTTCTGATCTATCTGGCATCCACT CTGGCATCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCGGC AGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCACCATC AGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTAT TACTGTCTAGGTGGTTGTGATGATGATGCTGAT ACTTTTGCTTTCCGGCGAGGGACTGAGGTGGTG

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				GTCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAG GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA
19	346C6-zu	Lanț greu	363	GAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTG GTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGT GCCGCCCTCCGGCTTCTCCCTGTCTCTCTACGCT ATGATCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGC CTGGAATGGATCGGCACCATCTCTACCGGCGGA ATTACCTACTACGCCCTCCTGGGCCAAGGGCCGG TTCACCATCTCCAGAGACAACTCCAAGAACACC CTGTACCTCCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTATTGTGCTAGAGGCGGC TACGCCGCCAGCTCCGCTTACTACCTGCCCTAC TACTTCGACCTGTGGGGCCAGGGCAACCCTCGTG ACAGTGTCTATCTGCATCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGG TGGAAGTCAGGCGCCCTGACCAGGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC CACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGCTCAGCCTCCTCACCGTCTGACCCAG

	mAb	Lanț IgG	ID. SECV. NR.	Secvența de acid nucleic
				GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCGGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCCGGGAAATGA
20	346C6-zu	Lanț ușor	364	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTG TCCGCTTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCAGTCCTCCAGTCCGTGTATAACAACAAC AACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAG GTGCCCAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTCCACA CTGGCCTCTGGCGTGGCCTCTAGATTCTCCGGC TCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATC AGCTCCCTCCAGTGCGAGGATGCCGCCACCTAC TATTGCCCTGGGCGGCTGCGACGACGACGCCGAT ACCTTTGCTTTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAA ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCACTCTGTCTC ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAG GAGAGTGTACACAGCAGGACAGCAAGCAGCAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA
* Secvențele de acid nucleic enumerate nu includ secvențe lider.				

- 5 Așa cum se descrie în acest document, un ADC făcut cunoscut în acest document poate cuprinde orice set de domenii variabile ale lanțului greu și ușor enumerate în tabelele de mai sus (de exemplu, domenii variabile ale lanțului greu și ușor ale MORAb-003, sau domenii variabile ale lanțului greu și ușor ale trastuzumab), sau setul din șase secvențe CDR din setul de lanț greu și ușor. Așa cum se descrie în acest document, ADC-ul cuprinde în continuare domenii constante ale lanțului greu și ușor uman sau fragmente ale acestora. De exemplu, ADC-ul poate cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG uman (cum ar fi o IgG1) și un domeniu constant al lanțului ușor kappa sau lambda uman. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-urilor descrise cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de imunoglobulină G subtipul 1 (IgG1) uman cu un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig umană.
- 10 Așa cum se descrie în acest document, antigenul de cancer țintă pentru un ADC este receptorul alfa al folatului ("FRA").

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde trei CDR-uri ale lanțului greu și trei CDR-uri ale lanțului ușor după cum urmează: CDR1 a lanțului greu (HCDR1) constituită din ID. SECV. NR.: 2, CDR2 a lanțului greu (HCDR2) constituită din ID. SECV. NR.: 3, CDR3 a lanțului greu (HCDR3) constituită din ID. SECV. NR.: 4; CDR1 a lanțului ușor (LCDR1) constituită din ID. SECV. NR.: 7, CDR2 a lanțului ușor (LCDR2) constituită din ID. SECV. NR.: 8, și CDR3 a lanțului ușor (LCDR3) constituită din ID. SECV. NR.: 9, așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 și 1991))).

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde trei CDR-uri ale lanțului greu și trei CDR-uri ale lanțului ușor după cum urmează: CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 13, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 14, CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 15; CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 16, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 17, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 18, așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT (International ImMunoGeneTics Information System (IMGT®)).

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 23, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 24. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu având ID. SECV. NR.: 23 și secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 24, sau secvențe care sunt cel puțin 95% identice cu secvențele menționate mai sus. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA sau fragmentul de legare la antigen al acestuia are o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu, care este cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99% identică cu ID. SECV. NR.: 23 și o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor care este cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99% identică cu ID. SECV. NR.: 24.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană cu un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig umană.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA cuprinde secvența de aminoacizi a lanțului greu având ID. SECV. NR.: 1 sau o secvență care este cel puțin 95% identică cu ID. SECV. NR.: 1, și secvența de aminoacizi a lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 6 sau o secvență care este cel puțin 95% identică cu ID. SECV. NR.: 6. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus cuprinde secvența de aminoacizi a lanțului greu având ID. SECV. NR.: 1 și secvența de aminoacizi a lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 6, sau secvențe care sunt cel puțin 95% identice cu secvențele menționate mai sus. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA are o secvență de aminoacizi a lanțului greu care este cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99% identică cu ID. SECV. NR.: 1 și/sau o secvență de aminoacizi a lanțului ușor care este cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99% identică cu ID. SECV. NR.: 6. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA cuprinde un lanț greu codificat de secvența de nucleotide având ID. SECV. NR.: 11 (cu nucleotidele care codifică secvența lider), sau ID. SECV. NR.: 345 (fără nucleotidele care codifică secvența lider); și un lanț ușor codificat de secvența de nucleotide având ID. SECV. NR.: 12 (cu nucleotidele care codifică secvența lider), sau ID. SECV. NR.: 346 (fără nucleotidele care codifică secvența lider). Așa cum se descrie în acest document, secvenței de aminoacizi a lanțului greu îi lipsește lizina C-terminală. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA are secvența de aminoacizi a anticorpului produs de o linie celulară depozitată în condiții în conformitate cu Tratatul de la Budapesta cu American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110 - 2209) în 24 aprilie 2006, sub numărul de acces PTA-7552, sau astfel de secvențe lipsite de lizina C-terminală a lanțului greu. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA este MORAb-003 (nume USAN: farletuzumab) (Ebel și colab., (2007) Cancer Immunity 7: 6), sau un fragment de legare la antigen al acestuia.

Așa cum se descrie în acest document, antigenul de cancer țintă pentru un ADC este receptorul factorului de creștere epidermică uman 2 ("her2").

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-her2 sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde trei CDR-uri ale lanțului greu și trei CDR-uri ale lanțului ușor după cum urmează: CDR1 a lanțului greu (HCDR1) constituită din ID. SECV. NR.: 71, CDR2 a lanțului greu (HCDR2) constituită din ID. SECV. NR.: 72, CDR3 a lanțului greu (HCDR3) constituită din ID. SECV. NR.: 73; CDR1 a lanțului ușor (LCDR1) constituită din ID. SECV. NR.: 74, CDR2 a lanțului ușor (LCDR2) constituită din ID. SECV. NR.: 75, și CDR3 a lanțului ușor

(LCDR3) constituită din ID. SECV. NR.: 76, așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-her2 sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde trei CDR-uri ale lanțului greu și trei CDR-uri ale lanțului ușor după cum urmează: CDR1 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 191, CDR2 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 192, CDR3 a lanțului greu constituită din ID. SECV. NR.: 193; CDR1 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 194, CDR2 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 195, și CDR3 a lanțului ușor constituită din ID. SECV. NR.: 196, așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-her2 sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 27, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 28. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-her2 sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu având ID. SECV. NR.: 27 și secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 28, sau secvențe care sunt cel puțin 95% identice cu secvențele menționate mai sus. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-her2 sau fragmentul de legare la antigen al acestuia are o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu care este cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99% identică cu ID. SECV. NR.: 27 și/sau o secvență de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor care este cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99% identică cu ID. SECV. NR.: 28.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-her2 cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig umană.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-her2 cuprinde secvența de aminoacizi a lanțului greu având ID. SECV. NR.: 327 sau o secvență care este cel puțin 95% identică cu ID. SECV. NR.: 327, și secvența de aminoacizi a lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 328 sau o secvență care este cel puțin 95% identică cu ID. SECV. NR.: 328. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus cuprinde secvența de aminoacizi a lanțului greu având ID. SECV. NR.: 327 și secvența de aminoacizi a lanțului ușor având ID. SECV. NR.: 328, sau secvențe care sunt cel puțin 95% identice cu secvențele menționate mai sus. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-her2 are o secvență de aminoacizi a lanțului greu, care este cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99% identică cu ID. SECV. NR.: 327 și o secvență de aminoacizi a lanțului ușor care este cel puțin 96%, cel puțin 97%, cel puțin 98%, sau cel puțin 99% identică cu ID. SECV. NR.: 328. Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-her2 este trastuzumab, sau un fragment de legare la antigen al acestuia.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-FRA sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde cele trei CDR-uri ale lanțului greu și cele trei CDR-uri ale lanțului ușor ale MORAb-003 sau în care CDR-urile includ nu mai mult de una, două, trei, patru, cinci, sau șase aditii, deleții sau substituții de aminoacizi ale HCDR1 (ID. SECV. NR.: 2 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 13 în conformitate cu IMGT), HCDR2 (ID. SECV. NR.: 3 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 14 în conformitate cu IMGT), HCDR3 (ID. SECV. NR.: 4 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 15 în conformitate cu IMGT); LCDR1 (ID. SECV. NR.: 7 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 16 în conformitate cu IMGT), LCDR2 (ID. SECV. NR.: 8 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 17 în conformitate cu IMGT), și LCDR3 (ID. SECV. NR.: 9 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 18 în conformitate cu IMGT).

Așa cum se descrie în acest document, anticorpus anti-her2 sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde cele trei CDR-uri ale lanțului greu și cele trei CDR-uri ale lanțului ușor ale trastuzumab sau în care CDR-urile includ nu mai mult de una, două, trei, patru, cinci, sau șase aditii, deleții sau substituții de aminoacizi ale HCDR1 (ID. SECV. NR.: 71 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 191 în conformitate cu IMGT), HCDR2 (ID. SECV. NR.: 72 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 192 în conformitate cu IMGT), HCDR3 (ID. SECV. NR.: 73 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 193 în conformitate cu IMGT); LCDR1 (ID. SECV. NR.: 74 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 194 în conformitate cu IMGT), LCDR2 (ID. SECV. NR.: 75 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 195 în conformitate cu IMGT), și LCDR3 (ID. SECV. NR.: 76 în conformitate cu Kabat, sau ID. SECV. NR.: 196 în conformitate cu IMGT).

Așa cum se descrie în acest document, substituțiile de aminoacizi sunt de reziduuri unice. Inserțiile vor fi, de obicei, de ordinul de la aproximativ 1 până la aproximativ 20 de reziduuri de aminoacizi, cu toate că pot fi tolerate inserții considerabil mai mari atât timp cât funcția biologică este păstrată (de exemplu, legarea la FRA sau her2). Delețiile variază de obicei de la aproximativ 1

- până la aproximativ 20 de reziduuri de aminoacizi, cu toate că în unele cazuri delețiile pot fi mult mai mari. Substituțiile, delețiile, inserțiile, sau orice combinație a acestora, pot fi utilizate pentru a ajunge la un derivat final sau o variantă finală. În general, aceste modificări sunt făcute pe câțiva aminoacizi pentru a minimiza modificarea moleculei, în particular imunogenicitatea și specificitatea proteinei de legare la antigen. Cu toate acestea, schimbări mai mari pot fi tolerate în anumite circumstanțe. Înlocuirile conservative sunt făcute în general în conformitate cu următoarea diagramă descrisă ca Tabelul 10.

Tabelul 10

Reziduu original	Substituții cu titlu de exemplu
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

- Prin selectarea substituțiilor care sunt mai puțin conservative decât cele arătate în Tabelul 10 sunt făcute modificări substanțiale ale funcției sau identității imunologice. Pentru exemplificare, pot fi făcute substituții care afectează mai semnificativ: structura structurii principale polipeptidice în zona alterării, pentru exemplificare structura alfa-eliceoidală sau de foaie beta; încărcătura sau hidrofobicitatea moleculei la situsul țintă; sau volumul lanțului lateral.
- Substituțiile care sunt așteptate, în general, să producă cele mai mari modificări ale proprietăților polipeptidice sunt cele în care (a) un reziduu hidrofil, de exemplu, seril sau treonil, este substituit cu (sau de) un reziduu hidrofob, de exemplu, leucil, izoleucil, fenilalanil, valil sau alanil; (b) o cisteină sau prolină este substituită cu (sau de) orice alt reziduu; (c) un reziduu având un lanț lateral electropozitiv, de exemplu, lizil, arginil, sau histidil, este substituit cu (sau de) un reziduu electronegativ, de exemplu, glutamil sau aspartil; sau (d) un reziduu având un lanț lateral voluminos, de exemplu, fenilalanină, este substituit cu (sau de) unul care nu are un lanț lateral, de exemplu, glicină.
- Așa cum se descrie în acest document, când într-un ADC sunt utilizate secvențe variante de anticorpi, variantele prezintă în mod tipic aceeași activitate biologică calitativă și vor provoca același răspuns imun, deși pot fi selectate, de asemenea, variante pentru a modifica după cum este necesar caracteristicile proteinelor de legare la antigen. Alternativ, varianta poate fi proiectată astfel încât activitatea biologică a proteinei de legare la antigen este alterată. Pentru exemplificare, situsurile de glicozilare pot fi alterate sau eliminate, așa cum a fost discutat în acest document.
- Diversi anticorpi pot fi utilizați cu ADC-urile care se utilizează în acest document pentru a ținti celulele canceroase. Așa cum se arată mai jos, toxinele linker în ADC-urile făcute cunoscute în acest document sunt surprinzător de eficiente cu diferiți anticorpi care țintesc antigenul tumoral.

Antigenii adecvați exprimați pe celule tumorale, dar nu pe celule sănătoase, sau exprimați pe celule tumorale la un nivel mai înalt decât pe celule sănătoase, sunt cunoscuți în domeniul de specialitate, la fel ca și anticorpii direcționați împotriva lor. Acești anticorpi pot fi utilizați cu linkerii și toxinele (de exemplu, eribulină) care sunt făcute cunoscute în acest document. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp țintește FRA. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp care țintește FRA este MORAb-003. Așa cum se descrie în acest document, în timp ce linkerii făcuți cunoscuți și toxina (eribulina) sunt surprinzător de eficienți cu mai mulți anticorpi diferiți care țintesc tumorile, porțiunile indivizibile de anticorp care țintesc FRA, cum ar fi MORAb-003, au furnizat raport medicament:anticorp, țintirea tumorii, uciderea vecinătăților, eficacitatea tratamentului, și ucidere departe de țintă redusă, deosebit de îmbunătățite. Eficacitatea îmbunătățită a tratamentului poate fi măsurată *in vitro* sau *in vivo*, și poate include o rată redusă de creștere a tumorii și/sau un volum tumoral redus.

Așa cum se descrie în acest document, sunt utilizați anticorpi față de alte ținte antigene și oferă cel puțin unele dintre proprietățile funcționale favorabile ale unui ADC cuprinzând o porțiune indivizibilă de anticorp care țintește FRA, cum ar fi MORAb-003 (de exemplu, raport medicament:anticorp îmbunătățit, eficacitate a tratamentului îmbunătățită, ucidere departe de țintă redusă, etc.). Așa cum se descrie în acest document, unele dintre, sau toate aceste proprietăți funcționale favorabile sunt observate atunci când linkerii făcuți cunoscuți și toxina (eribulina) se conjugă cu o porțiune indivizibilă de anticorp care țintește her2, cum ar fi trastuzumab. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp țintește her2. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp care țintește her2 este trastuzumab. Așa cum se descrie în acest document, unele dintre, sau toate aceste proprietăți funcționale favorabile sunt observate atunci când linkerii făcuți cunoscuți și toxina (eribulina) se conjugă cu o porțiune indivizibilă de anticorp care țintește MSLN, cum ar fi MORAb-009. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp țintește MSLN. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp care țintește MSLN este MORAb-009.

Linkeri

Așa cum se descrie în acest document, linkerul într-un ADC este stabil în mod extracelular într-o manieră suficientă pentru a fi eficient din punct de vedere terapeutic. Așa cum se descrie în acest document, linkerul este stabil în afara unei celule, astfel încât ADC rămâne intact atunci când este prezent în condiții extracelulare (de exemplu, înainte de transport sau livrare într-o celulă). Termenul "intact", utilizat în contextul unui ADC, înseamnă că porțiunea indivizibilă de anticorp rămâne atașată la porțiunea indivizibilă de medicament. Așa cum se utilizează în acest document, "stabil", în contextul unui linker sau ADC care cuprinde un linker, înseamnă că nu mai mult de 20%, nu mai mult de aproximativ 15%, nu mai mult de aproximativ 10%, nu mai mult de aproximativ 5%, nu mai mult de aproximativ 3%, sau nu mai mult de aproximativ 1% din linkerii (sau orice procent între acestea) într-o probă de ADC este scindat (sau, în cazul unui ADC global, nu sunt intacte altfel) atunci când ADC-ul este prezent în condiții extracelulare.

Dacă un linker este stabil în mod extracelular poate fi determinat, pentru exemplificare, prin includerea unui ADC în plasmă pentru o perioadă de timp predeterminată (de exemplu, 2, 4, 6, 8, 16, sau 24 de ore) și apoi cuantificarea cantității de porțiune indivizibilă de medicament liberă prezentă în plasmă. Stabilitatea poate lăsa ADC-ului timp să localizeze să țintească celulele tumorale și să prevină eliberarea prematură a medicamentului, ceea ce ar putea scădea indicele terapeutic al ADC-ului prin deteriorarea fără discriminare atât a țesuturilor normale cât și tumorale. Așa cum se descrie în acest document, linkerul este stabil în afara unei celule țintă și eliberează porțiunea indivizibilă de medicament din ADC odată ce e în interiorul celulei, astfel încât porțiunea indivizibilă de medicament se poate lega de ținta sa (de exemplu, la microtubuli). Astfel, un linker eficient: (i) va menține proprietățile specifice de legare ale porțiunii indivizibile de anticorp; (ii) va permite livrarea, de exemplu, livrarea intracelulară, a porțiunii indivizibile de medicament prin intermediul atașării stabile la porțiunea indivizibilă de anticorp; (iii) va rămâne stabil și intact până când ADC a fost transportat sau livrat la locul său țintă; și (iv) va permite efectul terapeutic, de exemplu, efectul citotoxic, al porțiunii indivizibile de medicament după scindare.

Linkerii pot avea impact asupra proprietăților fizico-chimice ale unui ADC. Pentru că mulți agenți citotoxici sunt de natură hidrofobă, legarea lor la anticorp cu o porțiune indivizibilă hidrofobă suplimentară poate duce la agregare. Agregatele ADC sunt insolubile și adesea limitează încărcarea realizabilă a medicamentului pe anticorp, ceea ce poate afecta în mod negativ potența ADC-ului. Agregatele proteice ale produselor biologice au fost, în general, de asemenea, legate de imunogenicitatea crescută. Așa cum se arată mai jos, linkerii făcuți cunoscuți în acest document au

ca rezultat ADC-uri cu niveluri de agregare scăzute și niveluri dorite de încărcare a medicamentului.

Un linker poate fi "scindabil" sau "non-scindabil" (Ducry și Stump, Bioconjugate Chem. (2010) 21: 5 - 13). Linkerii scindabili sunt concepuți să elibereze medicamentul atunci când sunt supuși anumitor factori de mediu, de exemplu, atunci când sunt internalizați în celula țintă, în timp ce linkerii non-scindabili se bazează, în general, pe degradarea porțiunii indivizibile de anticorp în sine.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker care nu poate fi scindat. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de medicament a ADC-ului este eliberată prin degradarea porțiunii indivizibile de anticorp. Linkerii care nu pot fi scindați tind să rămână asociați covalent cu cel puțin un aminoacid al anticorpului și medicamentului la internalizarea de celula țintă, și degradarea în interiorul celulei țintă. Linkerii care nu pot fi scindați includ în mod obișnuit o legătură tioeter, care este preparată prin conjugarea unei grupări tiol pe medicament sau anticorp cu o grupare maleimidă sau haloacetamidă pe anticorp sau medicament, respectiv (Goldmacher și colab., In Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins (G. L. Phillips ed., Springer, 2013)). Un linker care nu poate fi scindat cu titlu de exemplu cuprinde tioeter, ciclohexil, 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilat de N-succinimidil (SMCC), N-hidroxisuccinimidă (NHS), sau una sau mai multe porțiuni indivizibile de polietilen glicol (PEG), de exemplu, 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 porțiuni indivizibile PEG. Așa cum se descrie în acest document, linkerul care nu poate fi scindat cuprinde (PEG)₂. Așa cum se descrie în acest document, linkerul care nu poate fi scindat cuprinde (PEG)₄.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker care poate fi scindat. Un linker care poate fi scindat se referă la orice linker care cuprinde o porțiune indivizibilă care poate fi scindată. Așa cum este utilizat în acest document, termenul "porțiune indivizibilă care poate fi scindată" se referă la orice legătură chimică ce poate fi scindată. Legăturile chimice ce pot fi scindate adecvate sunt bine cunoscute în domeniul de specialitate și includ, dar nu sunt limitate la, legături labile la acid, legături labile la protează/peptidază, legături fotolabile, legături de disulfură, și legături labile la esterază. Linkerii care cuprind o porțiune indivizibilă care poate fi scindată pot permite eliberarea porțiunii indivizibile de medicament din ADC prin intermediul scindării la un anumit situs în linker. Așa cum se descrie în acest document, scindarea anticorpului de toxina legată activează sau crește activitatea toxinei. Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker care poate fi scindat (de exemplu, un linker Val-Cit) demonstrează ucidere a celulelor la țintă crescută și/sau ucidere scăzută a celulelor departe de țintă, în comparație cu un ADC care cuprinde un linker care nu poate fi scindat (de exemplu, un linker (PEG)₂ sau (PEG)₄ care nu poate fi scindat). Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker care poate fi scindat prezintă eficacitate îmbunătățită a tratamentului în raport cu un ADC care cuprinde un linker care nu poate fi scindat atunci când celulele și/sau cancerul tratat cu ADC-ul nu exprimă niveluri ridicate ale antigenului țintă (de exemplu, FRA sau her2). Așa cum se descrie în acest document, scindarea anticorpului de toxina legată este necesară pentru a obține o eficacitate îmbunătățită a tratamentului a unui ADC, așa cum este măsurat *in vitro* și/sau *in vivo*.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul este scindabil în condiții intracelulare, astfel încât scindarea linkerului eliberează suficient porțiunea indivizibilă de medicament de porțiunea indivizibilă de anticorp în mediul intracelular pentru a activa medicamentul și/sau a face medicamentul eficient din punct de vedere terapeutic. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de medicament nu este scindată de porțiunea indivizibilă de anticorp până când ADC-ul nu intră într-o celulă care exprimă un antigen specific pentru porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului, și porțiunea indivizibilă de medicament este scindată de porțiunea indivizibilă de anticorp la intrarea în celulă. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde o porțiune indivizibilă care poate fi scindată care este poziționată astfel încât nicio parte a linkerului sau a porțiunii indivizibile de anticorp nu rămâne legată la porțiunea indivizibilă de medicament la scindare. Linkeri scindabili cu titlu de exemplu includ linkeri labili la acid, linkeri sensibili la protează/peptidază, linkeri fotolabili, linkeri care conțin dimetil, disulfură, sau sulfonamidă.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker sensibil la pH, și este sensibil la hidroliză la anumite valori ale pH-ului. De obicei, linkerul sensibil la pH este scindabil în condiții acide. Această strategie de scindare profită în general de pH-ul mai scăzut în compartimentele intracelulare endozomale (pH ~ 5 - 6) și lizozomale (pH ~ 4,8), în comparație cu citosolul (pH ~ 7,4), pentru a declanșa hidroliza unei grupări labile la acid în linker, cum ar fi o hidrazonă (Jain și colab., (2015) Pharm Res, 32: 3526-40). Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker labil la acid și/sau hidrolizabil. Pentru exemplificare, poate fi folosit un linker labil la acid care este hidrolizabil în lizozom, și conține o grupare labilă la acid (de exemplu,

o hidrazonă, o semicarbazonă, o tiosemicarbazonă, o amidă cis-aconitică, un ortoester, un acetal, un ketal, sau altele asemenea). *A se vedea, de exemplu*, brevetele de invenție U.S. nr. 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik și Walker, (1999) Pharm. Therapeutics, 83: 67 - 123; Neville și colab., (1989) Biol. Chem., 264: 14653-61. Astfel de linkeri sunt relativ stabili în condiții de pH neutru, cum ar fi cei din sange, dar sunt instabili la pH sub 5,5 sau 5,0, pH-ul aproximativ al lizozomului. Așa cum se descrie în acest document, linkerul hidrolizabil este un linker tioeter (cum ar fi, de exemplu, un tioeter atașat la agentul terapeutic prin intermediul unei legături acilhidrazonă). *A se vedea, de exemplu*, brevetul de invenție U.S. nr. 5.622.929.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul este scindabil în condiții reducătoare. Așa cum se descrie în acest document, linkerul este scindabil în prezența unui agent reducător, cum ar fi glutatona sau ditiotritol. Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker disulfură scindabil sau un linker sulfonamidă scindabil.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker disulfură scindabil. În domeniul de specialitate este cunoscută o varietate de linkeri disulfură, incluzându-i, pentru exemplificare, pe cei care pot fi formați folosind SATA (N-succinimidil-5-acetiltioacetat), SPD (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionat), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirat) și SMPT (N-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)toluen), SPDB și SMPT. *A se vedea, de exemplu*, Thorpe și colab., (1987) Cancer Res., 47: 5924-31; Wawrzynczak și colab., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987). *A se vedea, de asemenea*, brevetul de invenție U.S. nr. 4.880.935. Linkerii disulfură sunt utilizați în mod obișnuit pentru a exploata abundența tiolilor intracelulari, care pot facilita scindarea legăturilor lor disulfură. Concentrațiile intracelulare ale tiolului intracelular cel mai abundent, glutatona redusă, sunt în general în intervalul 1-10 nM, care este de aproximativ 1.000 de ori mai mare decât acela al tiolului molecular scăzut cel mai abundent în sânge (adică, cisteină) la aproximativ 5 μM (Goldmacher și colab., In Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins (G. L. Phillips ed., Springer, 2013)). Enzimele intracelulare ale familiei de izomerază de disulfură a proteinei pot contribui, de asemenea, la scindarea intracelulară a unui linker disulfură. Așa cum este utilizat în acest document, un linker disulfură care poate fi scindat se referă la orice linker care cuprinde o porțiune indivizibilă de disulfură care poate fi scindată. Termenul "porțiune indivizibilă de disulfură care poate fi scindată" se referă la o legătură disulfură care poate fi scindată și/sau redusă, de exemplu, de un tiol sau enzimă. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de disulfură care poate fi scindată este disulfidil-dimetil.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker sulfonamidă care poate fi scindat. Așa cum este utilizat în acest document, un linker sulfonamidă care poate fi scindat se referă la orice linker care cuprinde o porțiune indivizibilă sulfonamidă care poate fi scindată. Termenul "porțiune indivizibilă sulfonamidă care poate fi scindată" se referă la o grupare sulfonamidă, adică o grupare sulfonil conectată la o grupare amină, în care legătura sulf-azot poate fi scindată.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul poate fi un linker de tip dendritic pentru atașarea covalentă a mai mult de o porțiune indivizibilă de medicament la o porțiune indivizibilă de anticorp printr-o porțiune indivizibilă linker multifuncțională, de ramificare. *A se vedea, de exemplu*, Sun și colab., (2002) Bioorg. Med. Chem. Lett., 12: 2213-5; Sun și colab., (2003) Bioorg. Med. Chem., 11: 1761-8. Linkerii dendritici pot crește raportul molar dintre medicament și anticorp, adică încărcarea medicamentului, care este legată de potența ADC-ului. Prin urmare, în cazul în care o porțiune indivizibilă de anticorp poartă doar o singură grupare cisteină tiol reactivă, pentru exemplificare, o multitudine de porțiuni indivizibile pot fi atașate printr-un linker dendritic. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă linker sau porțiunea indivizibilă de medicament-linker poate fi atașată la anticorp prin intermediul chimiei de punte de disulfură redusă sau tehnologiei limitate de utilizare a lizinei. *A se vedea, de exemplu*, Publ. Int. nr. WO2013173391 și WO2013173393.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul este scindabil de un agent de scindare, de exemplu, o enzimă, care este prezent în mediul intracelular (de exemplu, în interiorul unui lizozom sau endozom sau caveolae). Linkerul poate fi, de exemplu, un linker peptidic care este scindat de o peptidază intracelulară sau de o enzimă protează, incluzând, dar fără a se limita la, o protează lizozomală sau endozomală. Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker peptidic care poate fi scindat. Așa cum este utilizat în acest document, un linker peptidic care poate fi scindat se referă la orice linker care cuprinde o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată. Termenul "porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată" se referă la orice legătură chimică care leagă aminoacizii (derivați de aminoacizi naturali sau sintetici) care pot fi scindați de un agent care este prezent în mediul intracelular. De exemplu, un linker poate cuprinde o secvență alanină-

alanină-asparagină (Ala-Ala-Asn) sau o secvență valină-citrulină (Val-Cit) care este scindabilă de o peptidază cum ar fi catepsina, de exemplu, catepsina B.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker care poate fi scindat de enzimă și o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată în linker este scindabilă de către enzimă. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată este scindabilă de o enzimă lizozomală, de exemplu, catepsină. Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker care poate fi scindat de catepsină. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată în linker este scindabilă de o cisteină catepsină lizozomală, cum ar fi catepsina B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, sau W. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată este scindabilă de catepsina B. O dipeptidă cu titlu de exemplu care poate fi scindată de catepsina B este valină-citrulină (Val-Cit) (Dubowchik și colab., (2002) Bioconjugate Chem., 13: 855-69). Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată demonstrează niveluri de agregare mai mici și/sau o încărcare mai mare a medicamentului (*p*) în raport cu un ADC care cuprinde o porțiune indivizibilă care poate fi scindată alternativă (de exemplu, o porțiune indivizibilă de disulfură ce poate fi scindată sau o porțiune indivizibilă de sulfonamidă ce poate fi scindată).

Așa cum se descrie în acest document, linkerul sau porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată în linker cuprinde o unitate de aminoacizi. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi permite scindarea linkerului de către o protează, facilitând astfel eliberarea porțiunii indivizibile de medicament din ADC la expunerea la una sau mai multe proteaze intracelulare, cum ar fi una sau mai multe enzime lizozomale (Doronina și colab., (2003) Nat. Biotechnol., 21: 778-84; Dubowchik și Walker, (1999) Pharm. Therapeutics, 83: 67-123). Unitățile de aminoacizi cu titlu de exemplu includ, dar nu sunt limitate la, dipeptide, tripeptide, tetrapeptide, și pentapeptide. Dipeptidele cu titlu de exemplu includ, dar nu sunt limitate la, valină-citrulină (Val-Cit), alanină-asparagină (Ala-Asn), alanină-fenilalanină (Ala-Phe), fenilalanină-lizină (Phe-Lys), alanină-lizină (Ala-Lys), alanină-valină (Ala-Val), valină-alanină (Val-Ala), valină-lizină (Val-Lys), lizină-lizină (Lys-Lys), fenilalanină-citrulină (Phe-Cit), leucine-citrulină (Leu-Cit), izoleucină-citrulină (Ile-Cit), triptofan-citrulină (Trp-Cit), și fenilalanină-alanină (Phe-Ala). Tripeptidele cu titlu de exemplu includ, dar nu sunt limitate la, alanină-alanină-asparagină (Ala-Ala-Asn), glicină-valină-citrulină (Gly-Val-Cit), glicină-glicină-glicină (Gly-Gly-Gly), fenilalanină-fenilalanină-lizină (Phe-Phe-Lys), și glicină-fenilalanină-lizină (Gly-Phe-Lys). Alte unități de aminoacizi cu titlu de exemplu includ, dar nu sunt limitate la, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu, Phe-N⁹-tosil-Arg, și Phe-N⁹-Nitro-Arg, așa cum este descris în, de exemplu, brevetul de invenție U.S. nr. 6.214.345. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi în linker cuprinde Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi în linker cuprinde Ala-Ala-Asn. Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde Val-Cit demonstrează ucidere scăzută a celulelor departe de țintă, ucidere a celulelor la țintă crescută, niveluri de agregare mai mici, și/sau o încărcare mai mare a medicamentului (*p*) în raport cu un ADC care cuprinde o unitate de aminoacizi alternativă sau o porțiune indivizibilă care poate fi scindată alternativă. O unitate de aminoacizi poate cuprinde reziduuri de aminoacizi care apar în mod natural și/sau aminoacizi minori și/sau analogi de aminoacizi care nu apar în mod natural, cum ar fi citrulina. Unitățile de aminoacizi pot fi proiectate și optimizate pentru scindarea enzimatică de către o anumită enzimă, pentru exemplificare, o protează asociată tumorii, o protează lizozomală cum ar fi catepsina B, C, D sau S, sau o protează plasminică.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul în oricare dintre ADC-urile făcute cunoscute în acest document poate cuprinde cel puțin o unitate de distanțiere care unește porțiunea indivizibilă de anticorp cu porțiunea indivizibilă de medicament. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere unește un situs de scindare (de exemplu, o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată) în linker la porțiunea indivizibilă de anticorp. Așa cum se descrie în acest document, linkerul și/sau unitatea de distanțiere în linker sunt în mod substanțial hidrofile. Se poate utiliza un linker hidrofil pentru a reduce măsura în care medicamentul poate fi pompat afară din celulele canceroase rezistente prin rezistența multiplă la medicamente (MDR) sau transportori similari din punct de vedere funcțional. În unele aspecte, linkerul include una sau mai multe porțiuni indivizibile de polietilen glicol (PEG), de exemplu, 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 porțiuni indivizibile de PEG. Așa cum se descrie în acest document, linkerul este un linker PEG mai scurt, și oferă stabilitate îmbunătățită și agregare redusă față de linkeri PEG mai lungi.

Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere în linker cuprinde una sau mai multe porțiuni indivizibile de PEG. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde $-(\text{PEG})_m-$, și *m* este un număr întreg de la 1 până la 10. Așa cum se descrie în acest document, *m* variază de la 1 până la 10; de la 2 până la 8; de la 2 până la 6; de la 2 până la 5;

de la 2 până la 4; sau de la 2 până la 3. Așa cum se descrie în acest document, m este 8. Așa cum se descrie în acest document, m este 4. Așa cum se descrie în acest document, m este 3. Așa cum se descrie în acest document, m este 2. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde (PEG)₂, (PEG)₄, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₃-triazol-(PEG)₃, (PEG)₄-triazol-(PEG)₃, sau dibenzilciclooctenă-triazol-(PEG)₃. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde (PEG)₂. Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde o unitate de distanțiere mai scurtă (de exemplu, (PEG)₂) demonstrează niveluri de agregare mai mici și/sau o încărcare mai mare a medicamentului (p) în raport cu un ADC care cuprinde o unitate de distanțiere mai lungă (de exemplu, (PEG)₈).

Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere în linker cuprinde o porțiune indivizibilă alchil. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde $-(CH_2)_n-$, și n este un număr întreg de la 1 până la 10 (adică, n poate fi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, sau 10). Așa cum se descrie în acest document, n este 5. Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde o unitate de distanțiere mai scurtă (de exemplu, $(CH_2)_5$) demonstrează niveluri de agregare mai mici și/sau o încărcare mai mare a medicamentului (p) în raport cu un ADC care cuprinde o unitate de distanțiere mai lungă (de exemplu, (PEG)₈).

O unitate de distanțiere poate fi utilizată, pentru exemplificare, pentru a lega porțiunea indivizibilă de anticorp la porțiunea indivizibilă de medicament, fie în mod direct, fie în mod indirect. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere leagă porțiunea indivizibilă de anticorp la porțiunea indivizibilă de medicament în mod direct. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp și porțiunea indivizibilă de medicament sunt atașate prin intermediul unei unități distanțier care cuprinde una sau mai multe porțiuni indivizibile de PEG (de exemplu, (PEG)₂ sau (PEG)₄). Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere leagă porțiunea indivizibilă de anticorp la porțiunea indivizibilă de medicament în mod indirect. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere leagă porțiunea indivizibilă de anticorp la porțiunea indivizibilă de medicament în mod indirect printr-o porțiune indivizibilă care poate fi scindată (de exemplu, o peptidă care poate fi scindată, o disulfură care poate fi scindată, sau o sulfonamidă care poate fi scindată) și/sau o porțiune indivizibilă de atașare pentru a uni unitatea de distanțiere la porțiunea indivizibilă de anticorp, de exemplu, o porțiune indivizibilă de maleimidă.

Unitatea de distanțiere, așa cum se descrie în acest document, se atașează la porțiunea indivizibilă de anticorp (adică anticorpul sau fragmentul de legare la antigen) prin intermediul unei porțiuni indivizibile de maleimidă (Mal). Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde un linker atașat la porțiunea indivizibilă de anticorp prin intermediul unei porțiuni indivizibile de maleimidă demonstrează o încărcare de medicament mai mare (p) în raport cu un ADC care cuprinde un linker atașat la porțiunea indivizibilă de anticorp prin intermediul unei porțiuni indivizibile de atașare alternative, cum ar fi o porțiune indivizibilă de succinimidă.

O unitate de distanțiere care se atașează la anticorpul sau fragmentul de legare la antigen prin intermediul unei Mal este menționată în acest document ca o "unitate de distanțiere Mal". Termenul "porțiune indivizibilă de maleimidă", așa cum este utilizat în acest document, înseamnă un compus care conține o grupare maleimidă și care este reactiv cu o grupare sulfhidril, de exemplu, o grupare sulfhidril a unui reziduu de cisteină în porțiunea indivizibilă de anticorp. Alte grupări funcționale care sunt reactive cu grupările sulfhidril (tioli) includ, dar nu sunt limitate la, iodacetamidă, bromacetamidă, vinil piridină, disulfură, piridil disulfură, izocianat, și izotiocianat. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal este reactivă cu un reziduu de cisteină în anticorpul sau fragmentul de legare la antigen. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal este unită la anticorpul sau fragmentul de legare la antigen prin intermediul reziduuului de cisteină. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal cuprinde o porțiune indivizibilă de PEG. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal cuprinde o porțiune indivizibilă alchil.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere Mal și o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată cuprinde o unitate de aminoacizi. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi cuprinde Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere Mal și Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂ și Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG) _{m} și Val-Cit, unde m este 2 până la 8 sau 2 până la 5, sau 2, 3, 4 sau 5. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₈ și Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(CH₂)₅ și Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul

cuprinde unitatea de distanțiere Mal și Ala-Ala-Asn. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂ și Ala-Ala-Asn.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere Mal și o porțiune indivizibilă de disulfură ce poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de disulfură ce poate fi scindată este disulfidil-dimetil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere Mal și disulfidil-dimetil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₄-triazol-(PEG)₃ și disulfidil-dimetil.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere Mal și o porțiune indivizibilă de sulfonamidă ce poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₄-triazol-(PEG)₃ și sulfonamidă.

Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere se atașează la anticorpus sau fragmentul de legare la antigen prin intermediul unei porțiuni indivizibile de succinimidă (OSu). O unitate de distanțiere care se atașează la anticorpus sau fragmentul de legare la antigen prin intermediul unei OSu este menționată în acest document ca o "unitate de distanțiere OSu". Termenul "porțiune indivizibilă de succinimidă", așa cum este utilizat în acest document, înseamnă un compus care conține un compus de succinimidă care este reactiv cu o grupare amină, de exemplu, o grupare amină a unui reziduu de lizină în porțiunea indivizibilă de anticorpus. O porțiune indivizibilă de succinimidă cu titlu de exemplu este N-hidroxisuccinimida (NHS). Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere OSu este reactivă cu un reziduu de lizină în anticorpus sau fragmentul de legare la antigen. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere OSu este unită la anticorpus sau fragmentul de legare la antigen prin intermediul rezidului de lizină. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere OSu cuprinde o porțiune indivizibilă de PEG. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere OSu cuprinde o porțiune indivizibilă alchil.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere OSu și o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată cuprinde o unitate de aminoacizi. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi cuprinde Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi cuprinde Ala-Ala-Asn. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere OSu și Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₂ și Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₉ și Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(CH₂)₅ și Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃ și Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere OSu și Ala-Ala-Asn. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₂ și Ala-Ala-Asn.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere OSu și o porțiune indivizibilă de disulfură ce poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de disulfură ce poate fi scindată este disulfidil-dimetil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere OSu și disulfidil-dimetil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃ și disulfidil-dimetil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-dibenzilciclooctenă-triazol-(PEG)₃ și disulfidil-dimetil.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de distanțiere OSu și o porțiune indivizibilă de sulfonamidă ce poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃ și sulfonamidă. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-dibenzilciclooctenă-triazol-(PEG)₃ și sulfonamidă.

Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal sau unitatea de distanțiere OSu atașează porțiunea indivizibilă de anticorpus (adică anticorpus sau fragmentul de legare la antigen) la porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal sau unitatea de distanțiere OSu atașează anticorpus sau fragmentul de legare la antigen la o porțiune indivizibilă peptidică ce poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată cuprinde o unitate de aminoacizi. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitatea de aminoacid a unității de distanțiere Mal sau unitatea de distanțiere OSu. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal sau unitatea de distanțiere OSu cuprinde o porțiune indivizibilă de PEG. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal sau unitatea de distanțiere OSu cuprinde o porțiune indivizibilă alchil. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi cuprinde Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi cuprinde Ala-Ala-Asn.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde structura: unitate de distanțiere Mal-Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde structura: Mal-(PEG)₂-Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde structura: Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₈-Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(CH₂)₅-Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitate de distanțiere Mal-Ala-Ala-Asn. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂-Ala-Ala-Asn.

Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitate de distanțiere OSu-Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₂-Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₉-Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(CH₂)₅-Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃-Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitate de distanțiere OSu-Ala-Ala-Asn. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₂-Ala-Ala-Asn.

Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal sau unitatea de distanțiere OSu atașează anticorpul sau fragmentul de legare la antigen la o porțiune indivizibilă de disulfură ce poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitate de distanțiere Mal-disulfură sau unitate de distanțiere OSu-disulfură. Așa cum se descrie în acest document, disulfura este disulfidil-dimetil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitate de distanțiere Mal-disulfidil-dimetil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₄-triazol-(PEG)₃-disulfidil-dimetil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitate de distanțiere OSu-disulfidil-dimetil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃-disulfidil-dimetil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-dibenzilciclooctenă-triazol-(PEG)₃-disulfidil-dimetil.

Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere Mal sau unitatea de distanțiere OSu atașează anticorpul sau fragmentul de legare la antigen la o porțiune indivizibilă de sulfonamidă ce poate fi scindată. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitate de distanțiere Mal-sulfonamidă sau unitate de distanțiere OSu-sulfonamidă. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₄-triazol-(PEG)₃-sulfonamidă. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃-sulfonamidă. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-dibenzilciclooctenă-triazol-(PEG)₃-sulfonamidă.

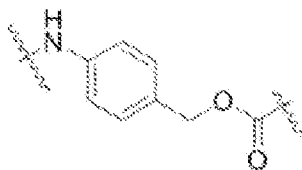
Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker este unită în mod direct la porțiunea indivizibilă de medicament. Așa cum se descrie în acest document, o altă unitate de distanțiere este utilizată pentru a atașa porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker la porțiunea indivizibilă de medicament. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de medicament este eribulină. Așa cum se descrie în acest document, eribulina este atașată la porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker printr-o unitate de distanțiere. Așa cum se descrie în acest document, eribulina este atașată la porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker printr-o unitate de distanțiere auto-distrugătoare. Așa cum se descrie în acest document, eribulina este atașată la porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker printr-o unitate de distanțiere auto-distrugătoare, porțiunea indivizibilă care poate fi scindată cuprinde Val-Cit, și o unitate de distanțiere suplimentară care cuprinde PEG unește porțiunea indivizibilă care poate fi scindată la porțiunea indivizibilă de anticorp. Așa cum se descrie în acest document, eribulina este unită la un anticorp anti-FRA prin intermediul unei unități de distanțiere Mal în linker unită la o porțiune indivizibilă care poate fi scindată Val-Cit și o unitate de distanțiere auto-distrugătoare pAB. Așa cum se descrie în acest document, eribulina este unită la un anticorp anti-her2 prin intermediul unei unități de distanțiere Mal în linker unită la o porțiune indivizibilă care poate fi scindată Val-Cit și o unitate de distanțiere auto-distrugătoare pAB.

O unitate de distanțiere poate fi "auto-distrugătoare" sau "non-auto-distrugătoare". O unitate de distanțiere "non-auto-distrugătoare" este una în care o parte din, sau toată unitatea de distanțiere rămâne legată la porțiunea indivizibilă de medicament la scindarea linkerului. Exemplele de unități distanțier non-auto-distrugătoare includ, dar nu sunt limitate la, o unitate de distanțiere glicină și o unitate de distanțiere glicină-glicină. Unitățile de distanțiere non-auto-distrugătoare se pot degrada în cele din urmă în timp, dar nu eliberează cu ușurință un medicament legat nativ în întregime în condiții celulare. O unitate de distanțiere "auto-distrugătoare" permite eliberarea porțiunii indivizibilă de medicament native în condiții intracelulare. Un "medicament nativ" este unul în care nicio parte a unității de distanțiere sau altă modificare chimică nu rămâne după scindarea/degradarea unității de distanțiere.

Chimia de auto-distrugere este cunoscută în domeniul de specialitate și ar putea fi selectată cu ușurință pentru ADC-urile făcute cunoscute. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere care atașează porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker la porțiunea indivizibilă de medicament (de exemplu, eribulină) este auto-distrugătoare, și suferă auto-distrugere concomitent cu, sau puțin înainte/după scindarea porțiunii indivizibile care poate fi scindată în condiții intracelulare.

Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere auto-distrugătoare în linker cuprinde o unitate p-aminobenzil. Așa cum se descrie în acest document, un alcool p-aminobenzilic (pABOH) este atașat la o unitate de aminoacizi sau la altă porțiune indivizibilă care poate fi scindată în linker prin intermediul unei legături amidă, și un carbamat, metilcarbamat, sau carbonat este făcut între pABOH și porțiunea indivizibilă de medicament (Hamann și colab., (2005) Expert Opin. Ther. Patents, 15: 1087-103). Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere auto-distrugătoare este sau cuprinde p-aminobenziloxycarbonil (pAB). Fără a fi legat de teorie, se crede că auto-distrugerea pAB implică o reacție spontană de 1,6-eliminare (Jain și colab., (2015) Pharm Res, 32: 3526-40).

Așa cum se descrie în acest document, structura p-aminobenziloxycarbonilului (pAB) utilizat în ADC-urile făcute cunoscute este prezentată mai jos:



p-amino-benziloxycarbonil

Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere auto-distrugătoare atașează porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker la amina C-35 pe eribulină. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere auto-distrugătoare este pAB. Așa cum se descrie în acest document, pAB atașează porțiunea indivizibilă care poate fi scindată în linker la amina C-35 pe eribulină. Așa cum se descrie în acest document, pAB suferă auto-distrugere la scindarea porțiunii indivizibile care poate fi scindată, iar eribulina este eliberată din ADC în forma sa nativă, activă. Așa cum se descrie în acest document, un anticorp anti-FRA (de exemplu, MORAb-003) este unit la amina C-35 a eribulinei printr-un linker care cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. Așa cum se descrie în acest document, un anticorp anti-her2 (de exemplu, trastuzumab) este unit la amina C-35 a eribulinei printr-un linker care cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB.

Așa cum se descrie în acest document, pAB suferă auto-distrugere la scindarea unei porțiuni indivizibile peptidice care poate fi scindată în linker. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă peptidică ce poate fi scindată cuprinde o unitate de aminoacizi. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde unitate de aminoacizi-pAB. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi este Val-Cit. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Val-Cit-pAB (VCP). Așa cum se descrie în acest document, unitatea de aminoacizi este Ala-Ala-Asn. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Ala-Ala-Asn-pAB.

Așa cum se descrie în acest document, pAB suferă auto-distrugere la scindarea unei porțiuni indivizibile de disulfură ce poate fi scindată în linker. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde disulfură-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde disulfidil-dimetil-pAB.

Așa cum se descrie în acest document, pAB suferă auto-distrugere la scindarea unei porțiuni indivizibile de sulfonamidă ce poate fi scindată în linker. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde sulfonamidă-pAB.

Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului este conjugată la porțiunea indivizibilă de medicament prin intermediul unui linker, unde linkerul cuprinde a unitate de distanțiere Mal, o unitate de aminoacizi care poate fi scindată, și un pAB. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde o porțiune indivizibilă de PEG. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde o porțiune indivizibilă alchil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂-unitate de aminoacizi-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₂-Ala-Ala-Asn-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₈-unitate de aminoacizi-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₈-Val-Cit-pAB. Așa cum se

descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(CH₂)₅-unitate de aminoacizi-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(CH₂)₅-Val-Cit-pAB.

5 Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului este conjugată la porțiunea indivizibilă de medicament prin intermediul unui linker, unde linkerul cuprinde unitate de distanțiere Mal-disulfură-pAB. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde o porțiune indivizibilă de PEG. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₄-triazol-(PEG)₃-disulfură-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₄-triazol-(PEG)₃-disulfidil-dimetil-pAB.

10 Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului este conjugată la porțiunea indivizibilă de medicament prin intermediul unui linker, unde linkerul cuprinde unitate de distanțiere Mal-sulfonamidă-pAB. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde o porțiune indivizibilă de PEG. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde Mal-(PEG)₄-triazol-(PEG)₃-sulfonamidă-pAB.

15 Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului este conjugată la porțiunea indivizibilă de medicament prin intermediul unui linker, unde linkerul cuprinde unitate de distanțiere OSu-unitate de aminoacid-pAB. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde o porțiune indivizibilă de PEG. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde o porțiune indivizibilă alchil. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₂-unitate de aminoacid-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₂-Ala-Ala-Asn-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₉-unitate de aminoacid-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₉-Val-Cit-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(CH₂)₅-unitate de aminoacid-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(CH₂)₅-Val-Cit-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃-unitate de aminoacid-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃-Val-Cit-pAB.

20 Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului este conjugată la porțiunea indivizibilă de medicament prin intermediul unui linker, unde linkerul cuprinde unitate de distanțiere OSu-disulfură-pAB. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde o porțiune indivizibilă de PEG. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃-disulfură-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃-disulfidil-dimetil-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-dibenzilciclooctenă-triazol-(PEG)₃-disulfură-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-dibenzilciclooctenă-triazol-(PEG)₃-disulfidil-dimetil-pAB.

25 Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului este conjugată la porțiunea indivizibilă de medicament prin intermediul unui linker, unde linkerul cuprinde unitate de distanțiere OSu-sulfonamidă-pAB. Așa cum se descrie în acest document, unitatea de distanțiere cuprinde o porțiune indivizibilă de PEG. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-(PEG)₃-triazol-(PEG)₃-sulfonamidă-pAB. Așa cum se descrie în acest document, linkerul cuprinde OSu-dibenzilciclooctenă-triazol-(PEG)₃-sulfonamidă-pAB.

30 Așa cum se descrie în acest document, linkerul este proiectat pentru a facilita uciderea vecinătăților (uciderea celulelor învecinate) prin scindare după internalizarea celulară și difuzia porțiunii indivizibile de medicament-linker și/sau a porțiunii indivizibile de medicament singură la celulele învecinate. Așa cum se descrie în acest document, linkerul promovează internalizarea celulară. Așa cum se descrie în acest document, linkerul este proiectat pentru a minimiza scindarea în mediul extracelular și, prin urmare, pentru a reduce toxicitatea în țesut departe de țintă (de exemplu, țesutul non-canceros), în același timp păstrând legarea ADC de țesutul țintă și uciderea vecinătăților a țesutului canceros care nu exprimă un antigen țintit de porțiunea indivizibilă de anticorp a unui ADC, dar înconjoară țesutul de cancer țintă care exprimă acel antigen. Așa cum se descrie în acest document, un linker care cuprinde o porțiune indivizibilă de maleimidă (Mal), o porțiune indivizibilă de polietilen glicol (PEG), valină-citrulină (Val-Cit sau "vc"), și un pAB oferă aceste caracteristici funcționale. Așa cum se descrie în acest document, un linker care cuprinde

35 Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB este deosebit de eficient în furnizarea acestor caracteristici funcționale, de exemplu, atunci când se unește o porțiune indivizibilă de anticorp anti-FRA cum ar fi MORAb-003 și o porțiune indivizibilă de medicament cum ar fi eribulina. Așa cum se descrie în acest document, cel puțin unele dintre aceste caracteristici funcționale pot fi observate, de asemenea, fără o porțiune indivizibilă de anticorp anti-FRA, și/sau fără MORAb-003. De exemplu, așa cum

40 se descrie în acest document, un linker care cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB este eficient în furnizarea unora dintre aceste caracteristici funcționale sau a tuturor caracteristicilor funcționale,

45

50

55

60

de exemplu, atunci cand se unește o porțiune indivizibilă de anticorp anti-her2 cum ar fi trastuzumab și o porțiune indivizibilă de medicament cum ar fi eribulina.

Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp este conjugată la porțiunea indivizibilă de medicament prin intermediul unui linker care cuprinde o porțiune indivizibilă de maleimidă (Mal), o porțiune indivizibilă de polietilen glicol (PEG), valină citrulină (Val-Cit sau "vc"), și un pAB. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de maleimidă atașează covalent porțiunea indivizibilă de medicament-linker la porțiunea indivizibilă de anticorp, și pAB acționează ca o unitate de distanțiere auto-distrugătoare. Un astfel de linker poate fi menționat ca linkerul "m-vc-pAB", linkerul "Mal-VCP", linkerul "Mal-(PEG)₂-VCP", sau linkerul "Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB". Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de medicament este eribulina. Structura Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-eribulinei este furnizată în Tabelul 46. pAB al linkerului Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB este atașat la amina C-35 pe eribulină.

S-a descoperit că ADC-urile care cuprind Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-eribulină demonstrează o combinație particulară de proprietăți dorite, în particular atunci când se împerechează cu un anticorp anti-FRA cum ar fi MORAb-003 sau un fragment de legare la antigen al acestuia. Aceste proprietăți includ, dar nu sunt limitate la, niveluri eficiente de încărcare a medicamentului ($p \sim 4$), niveluri de agregare scăzute, stabilitate în condiții de depozitare sau atunci cand sunt în circulație în corp (de exemplu, stabilitate serică), afinitate păstrată pentru celulele care exprimă ținta comparabil cu anticorpii neconjugați, citotoxicitate puternică împotriva celulelor care exprimă ținta, niveluri scăzute de ucidere a celulelor departe de țintă, niveluri ridicate de ucidere a vecinătăților, și/sau activitate anticancer *in vivo* eficientă, toate în comparație cu ADC-urile care utilizează alte porțiuni indivizibile de linker-toxină și/sau anticorp. În timp ce în domeniul de specialitate sunt cunoscute numeroase opțiuni de linker și combinații de distanțiere și situsuri de scindare, și pot oferi anumite beneficii în una sau mai multe dintre aceste categorii funcționale, combinația particulară dintre un linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB care unește eribulina la o porțiune indivizibilă de anticorp cum ar fi un anticorp anti-FRA (de exemplu, MORAb-003) poate oferi proprietăți bune sau superioare în spectrul proprietăților funcționale dorite pentru un ADC terapeutic. Așa cum se descrie în acest document, proprietățile funcționale bune sau superioare oferite de combinația particulară a unui linker Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB care unește eribulina la o porțiune indivizibilă de anticorp pot fi observate cu acest linker-toxină conjugat la, de exemplu, un anticorp anti-her 2, cum ar fi trastuzumab.

Așa cum se descrie în acest document, ADC cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-eribulină și o porțiune indivizibilă de anticorp care cuprinde un anticorp de internalizare sau un fragment de legare la antigen al acestuia care păstrează capacitatea de a ținti și internaliza într-o celulă tumorală. Așa cum se descrie în acest document, ADC cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-eribulină și un anticorp de internalizare sau un fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă FRA. Așa cum se descrie în acest document, anticorpii de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă FRA cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 2 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 3 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 4 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 7 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 8 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 9 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 13 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 14 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 15 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 16 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 17 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 18 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT. Așa cum se descrie în acest document, anticorpii de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă FRA cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 23, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 24. Așa cum se descrie în acest document, anticorpii de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă FRA cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig.

Așa cum se descrie în acest document, ADC are Formula I:



in care:

- (i) Ab este un anticorp anti-receptorul alfa al folatului (FRA) de internalizare sau un fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 2 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 3 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 4 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 7 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 8 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 9 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 13 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 14 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 15 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 16 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 17 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 18 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT;
- (ii) D este eribulină;
- (iii) L este un linker care poate fi scindat care cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; și
- (iv) p este un număr întreg de la 1 până la 20.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 23, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 24. Așa cum se descrie în acest document, anticorpul de internalizare este MORAb-003. Așa cum se descrie în acest document, p este de la 1 până la 8, sau de la 1 până la 6. Așa cum se descrie în acest document, p este de la 2 până la 8, sau 2 până la 5. Așa cum se descrie în acest document, p este de la 3 la 4. Așa cum se descrie în acest document, p este 4.

Așa cum se descrie în acest document, ADC cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-eribulină și un anticorp de internalizare sau fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă her2. Așa cum se descrie în acest document, anticorpul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă her2 cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 71 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 72 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 73 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 74 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 75 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 76 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 191 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 192 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 193 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 194 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 195 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 196 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT. Așa cum se descrie în acest document, anticorpul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă her2 cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 27, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 28. Așa cum se descrie în acest document, anticorpul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă her2 cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig.

Așa cum se descrie în acest document, ADC are Formula I:



in care:

- (i) Ab este un anticorp anti-receptorul factorului de creștere epidermic uman 2 (her2) de internalizare sau un fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 71 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 72 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 73 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 74 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 75 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 76 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 191 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 192 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 193 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențe de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 194 (LCDR1), ID.

SECV. NR.: 195 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 196 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT;

(ii) D este eribulină;

(iii) L este un linker care poate fi scindat care cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; și

5 (iv) *p* este un număr întreg de la 1 până la 20.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 27, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 28. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare este trastuzumab. Așa cum se descrie în acest document, *p* este de la 1 până la 8, sau de la 1 până la 6. Așa cum se descrie în acest document, *p* este de la 2 până la 8, sau 2 până la 5. Așa cum se descrie în acest document, *p* este de la 3 la 4. Așa cum se descrie în acest document, *p* este 4.

Așa cum se descrie în acest document, ADC cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-eribulină și un anticorpus de internalizare sau fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă mezotelina (MSLN). Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă MSLN cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 65 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 66 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 67 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 68 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 69 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 70 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 185 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 186 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 187 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 188 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 189 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 190 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă MSLN cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 25, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 26. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia care țintește o celulă tumorală care exprimă MSLN cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig.

Așa cum se descrie în acest document, ADC are Formula I:

Ab-(L-D)_p (I)

40

în care:

(i) Ab este un anticorpus anti-mezotelină de internalizare sau un fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 65 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 66 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 67 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 68 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 69 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 70 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 185 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 186 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 187 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 188 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 189 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 190 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT;

(ii) D este eribulină;

55 (iii) L este un linker care poate fi scindat care cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; și

(iv) *p* este un număr întreg de la 1 până la 20.

Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare sau fragmentul de legare la antigen de internalizare al acestuia cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 25, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 26. Așa cum se descrie în acest document, anticorpusul de internalizare este MORAb-003, MORAb-009, sau trastuzumab. Așa cum

60

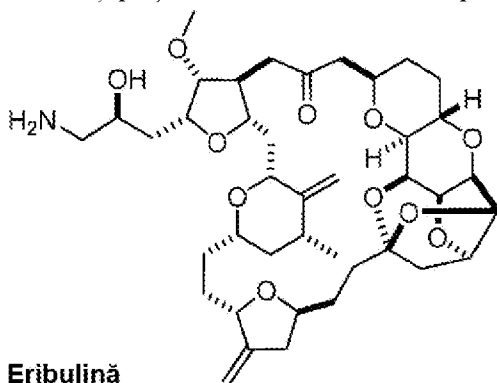
se descrie în acest document, p este de la 1 până la 8, sau de la 1 până la 6. Așa cum se descrie în acest document, p este de la 2 până la 8, sau 2 până la 5. Așa cum se descrie în acest document, p este de la 3 la 4. Așa cum se descrie în acest document, p este 4.

Porțiuni indivizibile de medicament

- 5 Porțiunea indivizibilă de medicament (D) a ADC-urilor descriși în acest document poate fi orice agent chimioterapeutic. Clasele utile de agenți chimioterapeutici includ, pentru exemplificare, agenți anti-tubulină. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de medicament este un agent anti-tubulină. Exemplele de agenți anti-tubulină includ criptoficina și eribulina. Porțiunea indivizibilă de medicament preferată pentru utilizare în ADC-urile descrise este eribulina.

Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de medicament este eribulina. Așa cum se descrie în acest document, linkerul ADC-ului este atașat prin intermediul aminei C-35 pe eribulină.

- 15 Așa cum se descrie în acest document, forma naturală a eribulinei utilizată pentru unirea la linker și porțiunea indivizibilă de anticorp este arătată mai jos:



Eribulină

- Așa cum se descrie în acest document, un intermediar, care este precursorul linkerului, este pus în reacție cu porțiunea indivizibilă de medicament în condiții corespunzătoare. Așa cum se descrie în acest document, grupările reactive sunt utilizate pe medicament și/sau intermediar sau linker. Produsul reacției dintre medicament și intermediar, sau medicamentul derivatizat, este pus în reacție ulterior cu anticorpul sau fragmentul de legare la antigen în condiții corespunzătoare. Alternativ, linkerul sau intermediarul poate fi pus în reacție mai întâi cu anticorpul sau un anticorp derivatizat, și apoi pus în reacție cu medicamentul sau medicamentul derivatizat.

- Pentru atașarea covalentă a medicamentelor și/sau a linkerilor la porțiunea indivizibilă de anticorp este disponibilă o serie de reacții diferite. Acest lucru este adesea obținut prin reacția unui sau mai multor reziduuri de aminoacizi ale moleculei de anticorp, incluzând grupările de amină ale lizinei, grupările de acid carboxilic libere ale acidului glutamic și acidului aspartic, grupările sulfhidril ale cisteinei, și diferitele porțiuni indivizibile ale aminoacizilor aromatici. De exemplu, atașarea covalentă non-specifică poate fi întreprinsă folosind o reacție de carbodiimidă pentru a lega o grupare carboxi (sau amino) pe un compus la o grupare amino (sau carboxi) pe o porțiune indivizibilă de anticorp. În plus, pentru a lega gruparea amino pe un compus la o grupare amino pe o porțiune indivizibilă de anticorp pot fi utilizați, de asemenea, agenți bifuncționali, cum ar fi dialdehidele sau imidoesterii. De asemenea, pentru atașarea medicamentelor la agenți de legare este disponibilă reacția de bază Schiff. Această metodă implică periodat oxidarea unui medicament care conține grupări glicol sau hidroxi, formând astfel o aldehydă care este apoi pusă în reacție cu agentul de legare. Atașarea are loc prin formarea unei baze Schiff cu grupări amino ale agentului de legare. Izotiocianații pot fi folosiți, de asemenea, ca agenți de cuplare pentru atașarea covalentă a medicamentelor la agenți de legare. Alte tehnici sunt cunoscute specialiștilor în domeniu și în cadrul domeniului de aplicare al prezentei descrieri a invenției.

Încărcarea medicamentului

- Încărcarea medicamentului este reprezentată prin p , și este menționată, de asemenea, în acest document, ca raportul medicament-anticorp (DAR). Încărcarea medicamentului poate varia de la 1 până la 20 de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp. Așa cum se descrie în acest document, p este un număr întreg de la 1 până la 20. Așa cum se descrie în acest document, p este un număr întreg de la 1 până la 10, 1 până la 9, 1 până la 8, 1 până la 7, 1 până la 6, 1 până la 5, 1 până la 4, 1 până la 3, sau 1 până la 2. Așa cum se descrie în acest document, p este un număr întreg de la 2 până la 10, 2 până la 9, 2 până la 8, 2 până la 7, 2 până la 6, 2 până la 5, 2 până la 4, sau 2 până la 3. Așa cum se descrie în acest document, p este un număr

întreg de la 3 la 4. Așa cum se descrie în acest document, p este 1, 2, 3, 4, 5, sau 6, preferabil 3 sau 4.

Încărcarea medicamentului poate fi limitată de numărul de situsuri de atașare în porțiunea indivizibilă de anticorp. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă linker (L) a ADC-ului se atașează la porțiunea indivizibilă de anticorp printr-o grupare activă din punct de vedere chimic pe unul sau mai multe reziduuri de aminoacizi în porțiunea indivizibilă de anticorp. Pentru exemplificare, linkerul poate fi atașat la porțiunea indivizibilă de anticorp prin intermediul unei grupări amino, imino, hidroxil, tiol sau carboxil libere (de exemplu, la capătul N- sau C-terminal, la gruparea amino epsilon a unui sau mai multor reziduuri de lizină, la gruparea de acid carboxilic liberă a unui sau mai multor reziduuri de acid glutamic sau acid aspartic, sau la gruparea sulfhidril a unui sau mai multor reziduuri de cisteină). Situsul la care este atașat linkerul poate fi un reziduu natural în secvența de aminoacizi a porțiunii indivizibile de anticorp, sau acesta poate fi introdus în porțiunea indivizibilă de anticorp, de exemplu, prin tehnologia ADN recombinant (de exemplu, prin introducerea unui reziduu de cisteină în secvența de aminoacid) sau prin biochimie proteică (de exemplu, prin reducere, ajustarea pH-ului sau hidroliză).

Așa cum se descrie în acest document, numărul porțiunilor indivizibile de medicament care pot fi conjugate la o porțiune indivizibilă de anticorp este limitat de numărul reziduurilor de cisteină libere. Pentru exemplificare, în cazul în care atașamentul este o grupare cisteină tiol, un anticorp poate avea doar una sau câteva grupări cisteină tiol, sau poate avea doar una sau câteva grupări tiol suficient de reactive prin care poate fi atașat un linker. În general, anticorpii nu conțin multe grupări cisteină tiol libere și reactive care pot fi legate la o porțiune indivizibilă de medicament. Într-adevăr, majoritatea reziduurilor cisteină tiol din anticorpi există ca punți disulfură. Atașarea excesivă de linker-toxină la un anticorp poate destabiliza anticorpu prin reducerea reziduurilor de cisteină disponibile pentru a forma punți disulfură. Prin urmare, un raport optim medicament:anticorp ar trebui să crească potența ADC-ului (prin creșterea numărului de porțiuni indivizibile de medicament atașate per anticorp) fără a destabiliza porțiunea indivizibilă de anticorp. Așa cum se descrie în acest document, un raport optim poate fi de aproximativ 3 - 4.

Așa cum se descrie în acest document, un linker atașat la o porțiune indivizibilă de anticorp printr-o porțiune indivizibilă Mal asigură un raport de aproximativ 3 - 4. Așa cum se descrie în acest document, un linker atașat la o porțiune indivizibilă de anticorp printr-o porțiune indivizibilă alternativă (de exemplu, o porțiune indivizibilă OSu) poate furniza un raport mai puțin optim (de exemplu, un raport mai mic, cum ar fi aproximativ 0 - 3). Așa cum se descrie în acest document, un linker care cuprinde o unitate de distanțiere scurtă (de exemplu, o unitate de distanțiere PEG scurtă cum ar fi $(\text{PEG})_2$ sau $(\text{PEG})_4$, sau o unitate de distanțiere alchil scurtă cum ar fi $(\text{CH}_2)_5$) asigură un raport de aproximativ 3 - 4. Așa cum se descrie în acest document, un linker care cuprinde o unitate de distanțiere mai lungă (de exemplu, $(\text{PEG})_8$) poate furniza un raport mai puțin optim (de exemplu, un raport mai mic, cum ar fi aproximativ 0 - 3). Așa cum se descrie în acest document, un linker care cuprinde o porțiune indivizibilă care poate fi scindată peptidică asigură un raport de aproximativ 3 - 4. Așa cum se descrie în acest document, un linker care cuprinde o porțiune indivizibilă care poate fi scindată alternativă (de exemplu, o disulfură care poate fi scindată sau o sulfonamidă care poate fi scindată) poate furniza un raport mai puțin optim (de exemplu, un raport mai mic, cum ar fi aproximativ 0 - 3). Așa cum se descrie în acest document, un ADC care cuprinde Mal- $(\text{PEG})_2$ -Val-Cit-pAB-eribulină unită la un anticorp cum ar fi un anticorp anti-FRA (de exemplu, MORAb-003) are un raport de aproximativ 3 - 4. Așa cum se descrie în acest document, un raport de aproximativ 3 - 4 este observat cu un ADC care cuprinde Mal- $(\text{PEG})_2$ -Val-Cit-pAB-eribulină unită la un anticorp diferit, cum ar fi un anticorp anti-her2 (de exemplu, trastuzumab). Așa cum se descrie în acest document, raportul optim observat cu ADC-uri care cuprind linker-toxină Mal- $(\text{PEG})_2$ -Val-Cit-pAB-eribulină este independent de anticorp.

Așa cum se descrie în acest document, o porțiune indivizibilă de anticorp este expusă condițiilor de reducere înainte de conjugare pentru a genera unul sau mai multe reziduuri de cisteină libere. Un anticorp, așa cum se descrie în acest document, poate fi redus cu un agent reducător, cum ar fi ditiotreit (DTT) sau tris(2-carboxietil)fosfină (TCEP), în condiții de reducere parțială sau totală, pentru a genera grupări cisteină tiol reactive. Cisteinele neimperecheate pot fi generate prin reducere parțială cu echivalenți molari de TCEP limitați, ceea ce reduce preferențial legăturile disulfură intercatenare care leagă lanțul ușor și lanțul greu (o pereche per împerechere HL) și cele două lanțuri grele în regiunea balama (două perechi per împerechere H-H în cazul IgG1 umane) în timp ce lasă intacte legăturile disulfură intracatenare (Stefano și colab., (2013) Methods Mol. Biol., 1045: 145-71). Așa cum se descrie în acest document, legăturile disulfură în interiorul anticorpilor sunt reduse electrochimic, de exemplu, prin întrebuițarea unui electrod de lucru care aplică o tensiune alternativă de reducere și oxidare. Această abordare poate permite cuplarea în-linie a reducerii legăturii disulfură la un dispozitiv

analitic (de exemplu, un dispozitiv de detectare electrochimică, un spectrometru RMN, sau un spectrometru de masă) sau un dispozitiv de separare chimică (de exemplu, un cromatograf lichid (de exemplu, un HPLC) sau un dispozitiv de electroforeză (a se vedea, de exemplu, Publ. U.S. nr. 20140069822)). Așa cum se descrie în acest document, un anticorp este supus condițiilor de denaturare pentru a dezvălui grupări nucleofile reactive pe reziduuri de aminoacizi, cum ar fi lizina sau cisteina.

Încărcarea medicamentului a unui ADC poate fi controlată în moduri diferite, de exemplu, prin: (i) limitarea excesului molar al intermediarului medicament-linker sau al reactivului linker în raport cu anticorpul; (ii) limitarea timpului sau temperaturii reacției de conjugare; (iii) condiții reductive parțiale sau limitative pentru modificarea cisteină tiolului; și/sau (iv) proiectarea prin inginerie prin tehnici recombinante a secvenței de aminoacizi a anticorpului astfel încât numărul și poziția reziduurilor de cisteină să fie modificate pentru controlul numărului și/sau poziției atașamentelor medicament-linker.

Așa cum se descrie în acest document, reziduurile de cisteină libere sunt introduse în secvența de aminoacizi a porțiunii indivizibile de anticorp. Pentru exemplificare, pot fi preparați anticorpi proiectați prin inginerie cu cisteină, în care unul sau mai mulți aminoacizi ai unui anticorp părinte sunt înlocuiți cu un aminoacid cisteină. Orice formă de anticorp poate fi astfel proiectată prin inginerie, adică mutată. Pentru exemplificare, un fragment de anticorp Fab părinte poate fi proiectat prin inginerie pentru a forma un Fab proiectat prin inginerie cu cisteină, menționat ca "ThioFab". În mod similar, un anticorp monoclonal părinte poate fi proiectat prin inginerie pentru a forma un "ThioMab". O mutație la un singur situs produce un singur reziduu de cisteină proiectat prin inginerie într-un ThioFab, în timp ce o mutație la un singur situs produce două reziduuri de cisteină proiectate prin inginerie într-un ThioMab, datorită naturii dimerice a anticorpului IgG. ADN-ul care codifică o variantă a secvenței de aminoacizi a polipeptidei părinte poate fi preparat printr-o varietate de metode cunoscute în domeniul de specialitate (a se vedea, de exemplu, metodele descrise în WO2006/034488). Aceste metode includ, dar nu sunt limitate la, prepararea prin mutagenезă dirijată în situs (sau mediată de oligonucleotide), mutagenезă PCR, și mutagenезă de casetă a unui ADN preparat anterior care codifică polipeptida. Variante de anticorpi recombinanți pot fi construite, de asemenea, prin manipularea fragmentului de restricție sau prin suprapunerea extensiei PCR cu oligonucleotide sintetice. ADC-urile cu Formula I includ, dar nu sunt limitate la, anticorpi care au 1, 2, 3, sau 4 aminoacizi de cisteină proiectați prin inginerie (Lyon și colab., (2012) *Methods Enzymol.*, 502: 123-38). Așa cum se descrie în acest document, unul sau mai multe reziduuri de cisteină libere sunt deja prezente într-o porțiune indivizibilă de anticorp, fără utilizarea proiectării prin inginerie caz în care reziduurile de cisteină libere existente pot fi utilizate pentru a conjuga porțiunea indivizibilă de anticorp la o porțiune indivizibilă de medicament.

Așa cum se descrie în acest document, o încărcare de medicament mai mare (de exemplu, $p > 5$) poate provoca agregarea, insolubilitatea, toxicitatea, sau pierderea permeabilității celulare a anumitor conjugați anticorp-medicament. O încărcare mai mare a medicamentului poate afecta negativ farmacocinetica (de exemplu, clearance-ul) anumitor ADC-uri. Așa cum se descrie în acest document, o încărcare mai mică a medicamentului (de exemplu, $p < 3$) poate reduce potența anumitor ADC-uri împotriva celulelor care exprimă ținta și/sau a celulelor vecine. Așa cum se descrie în acest document, încărcarea medicamentului pentru un ADC din prezenta descriere a invenției variază de la 1 până la aproximativ 8; de la aproximativ 2 până la aproximativ 6; de la aproximativ 2 până la aproximativ 5; de la aproximativ 3 până la aproximativ 5; sau de la aproximativ 3 până la aproximativ 4.

În cazul în care mai mult de o grupare nucleofilă reacționează cu un intermediar medicament-linker sau un reactiv cu porțiune indivizibilă linker urmat de reactiv cu porțiune indivizibilă de medicament, într-un amestec de reacție care cuprinde mai multe copii ale porțiunii indivizibile de anticorp și porțiunii indivizibile linker, atunci produsul rezultat poate fi un amestec de compuși ADC cu o distribuție de una sau mai multe porțiuni indivizibile de medicament atașate la fiecare copie a porțiunii indivizibile de anticorp în amestec. Așa cum se descrie în acest document, încărcarea medicamentului într-un amestec de ADC-uri care rezultă dintr-o reacție de conjugare variază de la 1 până la 20 de porțiuni indivizibile de medicament atașate per porțiune indivizibilă de anticorp. Numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp (adică, încărcarea medie a medicamentului, sau p mediu) poate fi calculat prin orice metodă convențională cunoscută în domeniul de specialitate, de exemplu, prin spectrometrie de masă (de exemplu, LC-MS în fază inversă), și/sau cromatografie lichidă de înaltă performanță (de exemplu, HIC-HPLC). Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este determinat prin cromatografie cu interacțiune hidrofobă-cromatografie lichidă de înaltă performanță (HIC-HPLC).

Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este determinat prin cromatografie lichidă în fază inversă-spectrometrie de masă (LC-MS). Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de la aproximativ 3 la aproximativ 4; de la aproximativ 3,1 până la aproximativ 3,9; de la aproximativ 3,2 to aproximativ 3,8; de la aproximativ 3,2 până la aproximativ 3,7; de la aproximativ 3,2 până la aproximativ 3,6; de la aproximativ 3,3 până la aproximativ 3,8; sau de la aproximativ 3,3 până la aproximativ 3,7. Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de la aproximativ 3,2 până la aproximativ 3,8. Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de aproximativ 3,8. Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de la 3 la 4; de la 3,1 până la 3,9; de la 3,2 până la 3,8; de la 3,2 până la 3,7; de la 3,2 până la 3,6; de la 3,3 până la 3,8; sau de la 3,3 până la 3,7. Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de la 3,2 până la 3,8. Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de 3,8.

Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de la aproximativ 3,5 până la aproximativ 4,5; de la aproximativ 3,6 până la aproximativ 4,4; de la aproximativ 3,7 până la aproximativ 4,3; de la aproximativ 3,7 până la aproximativ 4,2; sau de la aproximativ 3,8 până la aproximativ 4,2. Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de la aproximativ 3,6 până la aproximativ 4,4. Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de aproximativ 4,0. Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de la 3,5 până la 4,5; de la 3,6 până la 4,4; de la 3,7 până la 4,3; de la 3,7 până la 4,2; sau de la 3,8 până la 4,2. Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de la 3,6 până la 4,4. Așa cum se descrie în acest document, numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp este de 4,0.

Așa cum se descrie în acest document, termenul "aproximativ" așa cum este utilizat în ceea ce privește numărul mediu de porțiuni indivizibile de medicament per porțiune indivizibilă de anticorp înseamnă +/- 10%.

Compușii ADC individuali, sau "specii", pot fi identificați în amestec prin spectroscopie de masă și separați prin UPLC sau HPLC, de exemplu cromatografie cu interacțiune hidrofobă (HIC-HPLC). Așa cum se descrie în acest document, un ADC omogen sau aproape omogen cu o singură valoare de încărcare poate fi izolat din amestecul de conjugare, de exemplu, prin electroforeză sau cromatografie.

Așa cum se descrie în acest document, o încărcare a medicamentului și/sau o încărcare medie a medicamentului de aproximativ 4 asigură proprietăți benefice. Așa cum se descrie în acest document, o încărcare a medicamentului și/sau o încărcare medie a medicamentului mai mică de aproximativ 4 poate avea ca rezultat un nivel inacceptabil de ridicat al speciilor de anticorp neconjugat, care pot concura cu ADC pentru legarea la un antigen țintă și/sau poate asigura eficacitate redusă a tratamentului. Așa cum se descrie în acest document, o încărcare a medicamentului și/sau o încărcare medie a medicamentului mai mare de aproximativ 4 poate avea ca rezultat un nivel inacceptabil de ridicat al eterogenității produsului și/sau agregării ADC. O încărcare a medicamentului și/sau o încărcare medie a medicamentului mai mare de aproximativ 4 poate afecta, de asemenea, stabilitatea ADC-ului, din cauza pierderii uneia sau mai multor legături chimice necesare pentru a stabili porțiunea indivizibilă de anticorp.

Așa cum se descrie în acest document, un ADC are Formula I:



în care:

(i) Ab este un anticorp anti-receptorul alfa al folatului de internalizare sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 23, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 24;

(ii) D este eribulină;

(iii) L este un linker care poate fi scindat care cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; și

(iv) p este un număr întreg de la 3 la 4.

Așa cum se descrie în acest document, un ADC are Formula I:



în care:

(i) Ab este un anticorp anti-receptorul factorului de creștere epidermic uman 2 de internalizare sau fragmentul de legare la antigen al acestuia care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 27, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 28;

(ii) D este eribulină;

(iii) L este un linker care poate fi scindat care cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; și

(iv) p este un număr întreg de la 3 la 4.

Așa cum se descrie în acest document, p este 4.

Prezenta descriere a invenției include metode pentru producerea ADC-urilor descrise. Pe scurt, ADC-urile cuprind un anticorp sau un fragment de legare la antigen ca porțiunea indivizibilă de anticorp, o porțiune indivizibilă de medicament, și un linker care unește porțiunea indivizibilă de medicament și porțiunea indivizibilă de anticorp. Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile pot fi preparate folosind un linker care are funcționalități reactive pentru atașarea covalentă la porțiunea indivizibilă de medicament și la porțiunea indivizibilă de anticorp. Pentru exemplificare, așa cum se descrie în acest document, o cisteină tiol a unei porțiuni indivizibile de anticorp poate forma o legătură cu o grupare funcțională reactivă a unui linker sau a unui intermediar medicament-linker (de exemplu, o porțiune indivizibilă maleimidă) pentru a produce un ADC. Generarea ADC-urilor poate fi realizată prin orice tehnică cunoscută specialiștilor calificați.

Așa cum se descrie în acest document, un ADC este produs prin punerea în contact a unei porțiuni indivizibile de anticorp cu un linker și o porțiune indivizibilă de medicament într-o manieră secvențială, astfel încât porțiunea indivizibilă de anticorp este legată covalent mai întâi la linker, și apoi intermediarul anticorp-linker pre-format reacționează cu porțiunea indivizibilă de medicament. Intermediarul anticorp-linker poate fi supus sau nu unei etape de purificare înainte de punerea în contact a porțiunii indivizibile de medicament. Așa cum se descrie în acest document, un ADC este produs prin punerea în contact a unei porțiuni indivizibile de anticorp cu un compus linker medicament pre-format prin punerea în reacție a unui linker cu o porțiune indivizibilă de medicament. Compusul linker-medicament pre-format poate fi supus sau nu unei etape de purificare înainte de punerea în contact a porțiunii indivizibile de medicament. Așa cum se descrie în acest document, porțiunea indivizibilă de anticorp contactează linkerul și porțiunea indivizibilă de medicament într-un amestec de reacție, permițând formarea simultană a legăturilor covalente între porțiunea indivizibilă de anticorp și linker, și între linker și porțiunea indivizibilă de medicament. Această metodă de producere a ADC-urilor poate include o reacție, în care porțiunea indivizibilă de anticorp contactează porțiunea indivizibilă de anticorp înainte de adăugarea linkerului la amestecul de reacție, și vice versa. Așa cum se descrie în acest document, un ADC este produs prin punerea în reacție a unei porțiuni indivizibile de anticorp cu un linker atașat la o porțiune indivizibilă de medicament, cum ar fi Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB-eribulin, în condiții care permit conjugarea.

ADC-urile preparate în conformitate cu metodele descrise mai sus pot fi supuse unei etape de purificare. Etapa de purificare poate implica orice metode biochimice cunoscute în domeniul de specialitate pentru purificarea proteinelor, sau orice combinație a metodelor acestora. Acestea includ, dar nu sunt limitate la, filtrare cu flux tangențial (TFF), cromatografie de afinitate, cromatografie cu schimb de ioni, orice cromatografie bazată pe sarcină sau puncte izoelectrice, cromatografie în mod mixt, de exemplu, CHT (hidroxiapatită ceramică), cromatografie cu interacțiune hidrofobă, cromatografie de excludere a dimensiunii, dializă, filtrare, precipitare selectivă, sau orice combinație a acestora.

Utilizări terapeutice și compoziții

În acest document sunt făcute cunoscute metode pentru utilizarea ADC-urilor făcute cunoscute în tratarea unui subiect pentru o tulburare, de exemplu, o tulburare oncologică. ADC-urile pot fi administrate singure sau în combinație cu un al doilea agent terapeutic și pot fi administrate în orice formulare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic, dozare, și regim de dozare. Eficacitatea tratamentului cu ADC poate fi evaluată pentru toxicitate, precum și indicatori de eficacitate și ajustată în consecință. Măsurile de eficacitate includ, dar nu sunt limitate la, un efect citostatic și/sau citotoxic observat *in vitro* sau *in vivo*, volum al tumorii redus, inhibare a creșterii tumorii, și/sau supraviețuire prelungită.

Sunt cunoscute metode pentru a determina dacă un ADC exercită un efect citostatic și/sau citotoxic asupra unei celule. Pentru exemplificare, activitatea citotoxică sau citostatică a unui ADC poate fi măsurată prin: expunerea celulelor de mamifere care exprimă o proteină țintă a ADC-ului într-un mediu de cultură de celule; cultivarea celulelor pentru o perioadă de la aproximativ 6 ore până la aproximativ 5 zile; și măsurarea viabilității celulei. Analizele *in vitro* bazate pe celule pot fi utilizate, de asemenea, pentru a măsura viabilitatea (proliferarea), citotoxicitatea, și inducerea apoptozei (activarea caspazei) ale ADC-ului.

Pentru a determina dacă un conjugat anticorp-medicament exercită un efect citostatic, poate fi utilizată o analiză de incorporare a timidinei. Pentru exemplificare, celulele canceroase care exprimă un antigen țintă la o densitate de 5.000 de celule/godeu dintr-o placă cu 96 de godeuri pot fi cultivate pentru o perioadă de 72 de ore și expuse la 0,5 μ Ci de 3 H-timidină pe parcursul ultimelor 8 ore din perioada de 72 de ore. Incorporarea de 3 H-timidina în celulele culturii este măsurată în prezența și absența ADC-ului.

Pentru determinarea citotoxicității se poate măsura necroza sau apoptoza (moartea celulară programată). Necroza este însoțită de obicei de o permeabilitate crescută a membranei plasmactice; umflarea celulei, și ruperea membranei plasmactice. Apoptoza este caracterizată de obicei prin sangerarea membranei, condensarea citoplasmei, și activarea endonucleazelor endogene. Determinarea oricăruia dintre aceste efecte asupra celulelor canceroase indică faptul că un ADC este util în tratamentul cancerelor.

Viabilitatea celulei poate fi măsurată, de exemplu, determinând într-o celulă absorbția unui colorant, cum ar fi roșu neutru, albastru tripan, violet de gențiană, sau albastru ALAMARTM (a se vedea, de exemplu, Page și colab., (1993) Intl. J. Oncology, 3: 473-6). Într-o astfel de analiză, celulele sunt incubate în medii care conțin colorantul, celulele sunt spălate, iar colorantul rămas, care reflectă absorbția celulară a colorantului, este măsurat spectrofotometric. Așa cum se descrie în acest document, potența *in vitro* a ADC-urilor preparate este evaluată folosind o analiză cu violet de gențiană. Violetul de gențiană este un colorant triarilmetan care se acumulează în nucleul celulelor viabile. În această analiză, celulele sunt expuse ADC-urilor sau agenților de control pentru o perioadă de timp definită, după care celulele sunt colorate cu violet de gențiană, spălate abundant cu apă, apoi solubilizate cu SDS 1% și citite spectrofotometric. Pentru a măsura citotoxicitatea poate fi utilizat, de asemenea, colorantul de legare la proteină sulforodamină B (SRB) (Skehan și colab., (1990) J. Natl. Cancer Inst., 82: 1107-12).

Apoptoza poate fi cuantificată, pentru exemplificare, prin măsurarea fragmentării ADN-ului. Sunt disponibile metode fotometrice comerciale pentru determinarea cantitativă *in vitro* a fragmentării ADN-ului. Exemple de astfel de analize, inclusiv TUNEL (care detectează incorporarea nucleotidelor marcate în ADN fragmentat) și analize bazate pe ELISA, sunt descrise în Biochemica (1999), nr. 2, p. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Apoptoza poate fi determinată, de asemenea, prin măsurarea modificărilor morfologice într-o celulă. Pentru exemplificare, ca și în cazul necrozei, pierderea integrității membranei plasmactice poate fi determinată prin măsurarea absorbției anumitor coloranți (de exemplu, un colorant fluorescent, cum ar fi, pentru exemplificare, portocaliul de acridină sau bromura de etidiu). O metodă pentru măsurarea numărului de celule apoptotice a fost descrisă de Duke și Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan și colab., ed. (1992) p. 3.17.1-3.17.16). Celulele pot fi marcate, de asemenea, cu un colorant ADN (de exemplu, portocaliu de acridină, bromură de etidiu sau iodură de propidiu) și celulele observate pentru condensarea cromatinei și marginație de-a lungul membranei nucleare interioare. Alte modificări morfologice care pot fi măsurate pentru a determina apoptoza includ, de exemplu, condensarea citoplasmatică, sangerare a membranei crescute, și contracția celulară.

ADC-urile făcute cunoscute pot fi evaluate, de asemenea, pentru activitatea de ucidere a vecinătăților. Activitatea de ucidere a vecinătăților poate fi determinată, de exemplu, printr-o analiză care folosește două linii celulare, una pozitivă pentru antigenul țintă și una negativă pentru antigenul țintă. Liniile celulare sunt, preferabil, marcate, pentru a le diferenția. Pentru exemplificare, celulele IGROV1 (FRA+) marcate cu NuclightTM Green (NLG) și HL-60 (FRA-) marcate cu NuclightTM Red (NLR) pot fi co-cultivate, tratate cu un ADC anti-FRA, după care urmează monitorizarea citotoxicității. Uciderea celulelor țintă negative la antigen atunci când sunt amestecate cu celule țintă pozitive la antigen este un indicativ pentru uciderea vecinătăților, în timp ce uciderea celulelor țintă negative la antigen în absența celulelor țintă pozitive la antigen este un indicativ pentru ucidere departe de țintă.

În unele aspecte, prezenta descriere a invenției furnizează o metodă de ucidere, inhibare sau modulare a creșterii, sau interferare cu metabolismul unei celule canceroase sau unui țesut canceros prin perturbarea tubulinei. Metoda poate fi utilizată cu orice subiect în care perturbarea tubulinei oferă un beneficiu terapeutic. Subiecții care pot beneficia de perturbarea tubulinei includ,

dar nu sunt limitați la, cei care au sau prezintă riscul de a avea un cancer gastric, cancer ovarian (de exemplu, cancer ovarian seros), cancer pulmonar (de exemplu, cancer pulmonar cu celule non-mici), cancer mamar (de exemplu, cancer mamar triplu negativ), cancer endometrial (de exemplu, carcinom endometrial seros), osteosarcom, sarcom Kaposi, cancer cu celule germinale testiculare, leucemie, limfom (de exemplu, boala Hodgkin, limfom non-Hodgkin), mielom, cancer de cap și gât, cancer esofagian, cancer pancreatic, cancer de prostată, cancer cerebral (de exemplu, glioblastom), cancer tiroidian, cancer colorectal, și/sau cancer de piele (de exemplu, melanom), sau orice metastaze ale acestora (Dumontet și Jordan, (2010) Nat. Rev. Drug Discov., 9: 790 - 803). Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile făcute cunoscute pot fi administrate în orice celulă sau țesut care exprimă FRA, cum ar fi o celulă canceroasă sau un țesut canceros care exprimă FRA. O descriere a invenției cu titlu de exemplu include o metodă de inhibare a semnalizării celulare mediată de FRA sau o metodă de ucidere a unei celule. Metoda poate fi utilizată cu orice celulă sau țesut care exprimă FRA, cum ar fi o celulă canceroasă sau o leziune metastatică. Exemplele nelimitative de cancere care exprimă FRA includ cancerul gastric, cancerul ovarian seros, cancerul ovarian cu celule clare, cancerul pulmonar cu celule non-mici, cancerul colorectal, cancerul de san triplu negativ, cancerul endometrial, carcinomul endometrial seros, carcinoidul pulmonar și osteosarcomul. Exemplele nelimitative de celule care exprimă FRA includ celulele de carcinom ovarian uman IGROV1 și OVCAR3, celulele de carcinom pulmonar cu celule non-mici uman NCI-H2110, și celulele care conțin un acid nucleic recombinant care codifică FRA sau o porțiune a acestuia.

Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile făcute cunoscute pot fi administrate în orice celulă sau țesut care exprimă her2, cum ar fi o celulă canceroasă sau un țesut canceros care exprimă her2. O descriere a invenției cu titlu de exemplu include o metodă de inhibare a semnalizării celulare mediată de her2 sau o metodă de ucidere a unei celule. Metoda poate fi utilizată cu orice celulă sau țesut care exprimă her2, cum ar fi o celulă canceroasă sau o leziune metastatică. Exemplele nelimitative de cancere care exprimă her2 includ cancerul de sân, cancerul gastric, cancerul de vezică urinară, carcinomul de celule uroteliale, cancerul esofagian, cancerul pulmonar, cancerul de col uterin, cancerul endometrial și cancerul ovarian (English și colab., (2013) Mol. Diagn. Ther., 17: 85 - 99). Exemplele nelimitative de celule care exprimă her2 includ celulele de carcinom gastric uman NCI-N87-luc, celulele de carcinom ductal de san uman ZR75 și BT-474, și celulele care cuprind un acid nucleic recombinant care codifică her2 sau o porțiune a acestuia.

Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile făcute cunoscute pot fi administrate în orice celulă sau țesut care exprimă mezotelina (MSLN), cum ar fi o celulă canceroasă sau un țesut canceros care exprimă MSLN. O descriere a invenției cu titlu de exemplu include o metodă de inhibare a semnalizării celulare mediată de MSLN sau o metodă de ucidere a unei celule. Metoda poate fi utilizată cu orice celulă sau țesut care exprimă MSLN, cum ar fi o celulă canceroasă sau o leziune metastatică. Exemplele nelimitative de cancere care exprimă MSLN includ mezoteliomul, cancerul pancreatic (de exemplu, adenocarcinomul pancreatic), cancerul ovarian, și cancerul pulmonar (de exemplu, adenocarcinomul pulmonar) (Wang și colab., (2012) PLoS ONE, 7: e33214). Exemplele nelimitative de celule care exprimă MSLN includ celulele de carcinom ovarian uman OVCAR3, celulele endometroidice umane HEC-251, celulele de mezoteliom cu celule scuamoase pulmonare umane H226, și celulele care conțin un acid nucleic recombinant care codifică MSLN sau o porțiune a acestuia.

Metodele cu titlu de exemplu includ etapele de punere în contact a celulei cu un ADC, așa cum se descrie în acest document, într-o cantitate eficientă, adică o cantitate suficientă pentru a ucide celula. Metoda poate fi utilizată pe celule în cultură, de exemplu *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, sau *in situ*. Pentru exemplificare, celulele care exprimă FRA, her2, și/sau MSLN (de exemplu, celulele colectate prin biopsia unei leziuni tumorale sau metastatice; celulele dintr-o linie celulară de cancer stabilită; sau celulele recombinante), pot fi cultivate *in vitro* în mediu de cultură și etapa de punere în contact poate fi efectuată prin adăugarea ADC-ului la mediul de cultură. Metoda va avea ca rezultat uciderea celulelor care exprimă FRA, her2, și/sau MSLN, inclusiv în special a celulelor tumorale care exprimă FRA, her2, și/sau MSLN. Alternativ, ADC-ul poate fi administrat unui subiect pe orice rută de administrare adecvată (de exemplu, intravenos, subcutanat, sau contact direct cu un țesut tumoral) pentru a avea un efect *in vivo*.

Efectul *in vivo* al unei compoziții terapeutice de ADC făcute cunoscută poate fi evaluat într-un model animal adecvat. Pentru exemplificare, pot fi folosite modele de cancer xenogenice, în care explanții de cancer sau țesuturile de xenogrefă care au suferit pasaj sunt introduse în animale compromise imun, cum ar fi șoarecii nud sau SCID (Klein și colab., (1997) Nature Med., 3: 402-8). Eficacitatea poate fi prezisă folosind analize care măsoară inhibarea formării tumorii, regresia tumorii sau metastaza, și altele asemenea.

Pot fi utilizate, de asemenea, analize *in vivo* care evaluează stimularea apoptozei. Așa cum se descrie în acest document, xenogrefele de la șoareci purtători de tumoră tratați cu compoziția terapeutică pot fi examinate pentru prezența focarelor apoptotice și comparate cu șoareci purtători de xenogrefă de control netratați. Măsura în care focarele apoptotice se găsesc în

5 tumorile șoarecilor tratați oferă o indicație a eficacității terapeutice a compoziției.

În acest document sunt descrise suplimentar metode pentru tratarea cancerului. ADC-urile făcute cunoscute în acest document pot fi administrate unui mamifer non-uman sau unui subiect uman în scopuri terapeutice. Metodele terapeutice presupun administrarea către un mamifer care are o tumoră a unei cantități eficiente din punct de vedere biologic dintr-un ADC care cuprinde un

10 agent chimioterapeutic selectat (de exemplu, eribulină) legat de un anticorp de țintire care se leagă la un antigen exprimat, care este accesibil legării, sau este localizat pe o suprafață a celulei canceroase. O descriere cu titlu de exemplu este o metodă de livrare a unui agent chimioterapeutic la o celulă care exprimă FRA, care cuprinde conjugarea agentului chimioterapeutic la un anticorp care se leagă imunospecific la un epitop FRA și expune celula la ADC. Celulele tumorale cu titlu

15 de exemplu care exprimă FRA pentru care sunt indicate ADC-urile din prezenta descriere a invenției includ celule dintr-un cancer gastric, un cancer ovarian seros, un cancer pulmonar cu celule non-mici, un cancer colorectal, un cancer mamar (de exemplu, un cancer mamar triplu negativ), un carcinoid pulmonar, un osteosarcom, un cancer endometrial, și un carcinom endometrial cu histologie seroasă.

20 O altă descriere cu titlu de exemplu este o metodă de livrare a unui agent chimioterapeutic la o celulă care exprimă her2, care cuprinde conjugarea agentului chimioterapeutic la un anticorp care se leagă imunospecific la un epitop her2 și expune celula la ADC. Celulele tumorale cu titlu de exemplu care exprimă her2 pentru care sunt indicate ADC-urile din prezenta descriere a invenției includ celule dintr-un cancer mamar, un cancer gastric, un cancer de vezică urinară, un carcinom de celule uroteliale, un cancer esofagian, un cancer pulmonar, un cancer de

25 col uterin, un cancer endometrial, și un cancer ovarian.

O altă descriere cu titlu de exemplu este o metodă de livrare a unui agent chimioterapeutic la o celulă care exprimă MSLN, care cuprinde conjugarea agentului chimioterapeutic la un anticorp care se leagă imunospecific la un epitop MSLN și expune celula la

30 ADC. Celulele tumorale cu titlu de exemplu care exprimă MSLN pentru care sunt indicate ADC-urile din prezenta descriere a invenției includ celule dintr-un mezoteliom, un cancer pancreatic (de exemplu, un adenocarcinom pancreatic), un cancer ovarian, și un cancer pulmonar (de exemplu, adenocarcinom pulmonar).

O altă descriere cu titlu de exemplu este o metodă pentru tratarea unui pacient care are sau prezintă riscul de a avea un cancer care exprimă un antigen țintă pentru porțiunea indivizibilă de anticorp a ADC-ului, cum ar fi FRA, her2 sau MSLN, care cuprinde administrarea către pacient a unei cantități eficiente din punct de vedere terapeutic dintr-un ADC din prezenta descriere a invenției. Așa cum se descrie în acest document, pacientul nu răspunde sau răspunde slab la tratamentul cu un anticorp anti-FRA atunci când este administrat singur, și/sau la tratamentul cu o

40 porțiune indivizibilă de medicament (de exemplu, eribulină) atunci când este administrat singur. Așa cum se descrie în acest document, pacientul nu răspunde sau răspunde slab la tratamentul cu un anticorp anti-her2 atunci când este administrat singur, și/sau tratamentul cu o porțiune indivizibilă de medicament (de exemplu, eribulină) atunci când este administrat singur. Așa cum se descrie în acest document, pacientul nu răspunde sau răspunde slab la tratamentul cu un anticorp anti-MSLN atunci când este administrat singur, și/sau tratamentul cu o porțiune indivizibilă de medicament (de exemplu, eribulină) atunci când este administrat singur. Așa cum se descrie în acest document, pacientul este intolerant la tratamentul cu o porțiune indivizibilă de medicament (de exemplu, eribulină) atunci când este administrat singur. De exemplu, un pacient poate necesita doze de eribulină pentru a trata un cancer care duc la toxicitate sistemică, care sunt depășite prin livrarea țintită către un cancer care exprimă un antigen țintă pentru porțiunea

50 indivizibilă de anticorp a ADC-ului cum ar fi FRA, her2 sau MSLN, prin urmare reducând uciderea departe de țintă.

O altă descriere cu titlu de exemplu este o metodă pentru reducerea sau inhibarea creșterii unei tumori care exprimă antigen țintă (de exemplu, o tumoră care exprimă FRA, o tumoră care exprimă her2, sau o tumoră care exprimă MSLN), cuprinzând administrarea unei cantități eficiente din punct de vedere terapeutic dintr-un ADC. Așa cum se descrie în acest document, tratamentul este suficient pentru a reduce sau inhiba creșterea tumorii pacientului, pentru a reduce numărul sau dimensiunea leziunilor metastatice, pentru a reduce sarcina tumorală, pentru a reduce sarcina tumorală primară, pentru a reduce invazivitatea, pentru a prelungi timpul de supraviețuire, și/sau

60 pentru a menține sau îmbunătăți calitatea vieții. Așa cum se descrie în acest document, tumora este rezistentă sau refractară la tratamentul cu un anticorp anti-FRA atunci când este administrat singur,

și/sau tratamentul cu o porțiune indivizibilă de medicament (de exemplu, eribulină) atunci când este administrat singur. Așa cum se descrie în acest document, tumora este rezistentă sau refractară la tratamentul cu un anticorp anti-her2 atunci când este administrat singur, și/sau tratamentul cu o porțiune indivizibilă de medicament (de exemplu, eribulină) atunci când este administrat singur.

5 Așa cum se descrie în acest document, tumora este rezistentă sau refractară la tratamentul cu un anticorp anti-MSLN atunci când este administrat singur, și/sau tratamentul cu o porțiune indivizibilă de medicament (de exemplu, eribulină) atunci când este administrat singur.

Mai mult, anticorpii din prezenta descriere a invenției pot fi administrați unui mamifer non-uman care exprimă un antigen cu care ADC-ul este capabil să se lege în scopuri veterinare sau ca un model animal al bolii umane. În legătură cu acesta din urmă, astfel de modele animale pot fi utile pentru evaluarea eficacității terapeutice a ADC-urilor făcute cunoscute (de exemplu, testarea dozelor și a duratelor de timp de administrare).

În acest document sunt descrise suplimentar utilizări terapeutice ale ADC-urilor făcute cunoscute. O descriere cu titlu de exemplu este utilizarea unui ADC în tratamentul unui cancer care exprimă antigen țintă (de exemplu, un cancer care exprimă FRA, un cancer care exprimă her2, sau un cancer care exprimă MSLN). Sunt făcute cunoscute, de asemenea, ADC-uri pentru utilizare în tratamentul unui cancer care exprimă antigen țintă (de exemplu, un cancer care exprimă FRA, un cancer care exprimă her2, sau un cancer care exprimă MSLN). Metodele pentru identificarea subiecților care au cancer care exprimă FRA, her2, și/sau MSLN sunt cunoscute în domeniul de specialitate și pot fi utilizate pentru a identifica pacienții adecvați pentru tratament cu un ADC făcut cunoscut.

O altă descriere cu titlu de exemplu este utilizarea unui ADC într-o metodă de fabricare a unui medicament pentru tratamentul unui cancer care exprimă antigen țintă (de exemplu, un cancer care exprimă FRA, un cancer care exprimă her2, sau un cancer care exprimă MSLN).

25 Compozițiile terapeutice utilizate în practica metodelor de mai sus pot fi formulate în compoziții farmaceutice ce cuprind un transportor acceptabil din punct de vedere farmaceutic adecvat pentru metoda de livrare dorită. O descriere cu titlu de exemplu este o compoziție farmaceutică ce cuprinde un ADC din prezenta descriere a invenției și un transportor acceptabil din punct de vedere farmaceutic. Transportorii adecvați includ orice material care, atunci când este combinat cu compoziția terapeutică, păstrează funcția anti-tumorală a compoziției terapeutice și este, în general, non-reactiv cu sistemul imunitar al pacientului. Transportorii acceptabili din punct de vedere farmaceutic includ oricare și toți solvenții, oricare și toate mediile de dispersie, acoperirile, oricare și toți agenții antibacterieni și antifungici, agenții izotonici și de întârziere a absorbției, și alții similari care sunt compatibili din punct de vedere fiziologic. Exemplele de transportori acceptabili din punct de vedere farmaceutic includ unul sau mai mulți dintre apă, soluție salină, soluție salină tamponată cu fosfat, dextroză, glicerol, etanol, sare mesilat, și alții asemenea, precum și combinații ale acestora. În multe cazuri, va fi de preferat să se includă în compoziție agenți izotonici, pentru exemplificare, zaharuri, polialcoolii precum manitol, sorbitol, sau clorură de sodiu. Transportorii acceptabili din punct de vedere farmaceutic pot cuprinde suplimentar cantități minore de substanțe auxiliare, cum ar fi agenți de umectare sau de emulsionare, conservanți sau tampoanele, care sporesc durata de valabilitate sau eficacitatea ADC-ului.

Formulările terapeutice pot fi solubilizate și administrate prin intermediul oricărei rute capabile să livreze compoziția terapeutică la locul tumorii. Rutele de administrare potențial eficiente includ, dar nu sunt limitate la, ruta intravenoasă, parenterală, intraperitoneală, intramusculară, intratumorală, intradermică, intraorganică, ortotopică, și altele asemenea. Preparatele proteice terapeutice pot fi liofilizate și depozitate sub formă de pulberi sterile, preferabil sub vid, și apoi reconstituite în apă bacteriostatică (care conține, pentru exemplificare, conservant de alcool benzilic) sau în apă sterilă înainte de injecție. Formulările terapeutice pot cuprinde un ADC sau o sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic a acestuia, de exemplu, o sare mesilat.

ADC-urile făcute cunoscute în acest document pot fi administrate unui pacient care are nevoie de acestea la o doză care variază de la aproximativ 0,2 mg/kg până la aproximativ 10 mg/kg. Așa cum se descrie în acest document, ADC-ul este administrat pacientului zilnic, bilunar, sau orice perioadă de timp între acestea. Dozele și protocoalele de administrare pentru tratamentul cancerelor care utilizează metodele de mai sus vor varia în funcție de metodă și de cancerul țintă, și vor depinde în general de o serie de alți factori recunoscuți în domeniul de specialitate.

Pentru a administra unul sau mai multe ADC-uri din prezenta descriere a invenției sunt cunoscute și pot fi utilizate diverse sisteme de livrare. Metodele de administrare a ADC-urilor includ, dar nu sunt limitate la, administrarea parenterală (de exemplu, intradermică, intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă și subcutanată), administrarea epidurală,

administrarea intratumorală, și administrarea mucozală (de exemplu, căile intranasale și orale). În plus, poate fi utilizată administrarea pulmonară, de exemplu, prin utilizarea unui inhalator sau nebulizator, și formulare cu un agent de aerosolizare. *A se vedea, de exemplu*, compozițiile și metodele pentru administrare pulmonară descrise în brevetele de invenție U.S. nr. 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540, și 4.880.078; și Publ. PCT nr. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, și WO 99/66903. ADC-urile pot fi administrate prin orice rută convenabilă, pentru exemplificare, prin perfuzie sau injecție în bolus, sau prin absorbție prin căptușeli epiteliale sau mucocutanate (de exemplu, mucoasă orală, mucoasă rectală și intestinală etc.). Administrarea poate fi fie sistemică, fie locală.

Compozițiile terapeutice făcute cunoscute în acest document pot fi sterile și stabile în condițiile de fabricație și depozitare. Așa cum se descrie în acest document, un ADC sau mai mulți dintre ADC, sau o compoziție farmaceutică sau mai multe dintre compozițiile farmaceutice, se furnizează sub formă de pulbere liofilizată sterilizată uscată sau concentrat fără apă într-un recipient închis ermetic și pot fi reconstituite (de exemplu, cu apă sau soluție salină) la concentrația corespunzătoare pentru administrare unui subiect. Preferabil, unul sau mai mulți agenți profilactici sau terapeutici sau una sau mai multe compoziții farmaceutice sunt furnizate sub formă de pulbere liofilizată sterilă uscată într-un recipient închis ermetic la o doză unitară de cel puțin 5 mg, cel puțin 10 mg, cel puțin 15 mg, cel puțin 25 mg, cel puțin 35 mg, cel puțin 45 mg, cel puțin 50 mg, cel puțin 75 mg, sau cel puțin 100 mg, sau orice cantitate între acestea. Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile liofilizate sau compozițiile farmaceutice sunt depozitate la temperaturi între 2°C și 8°C în recipientul original. Așa cum se descrie în acest document, un ADC sau mai mulți dintre ADC, sau o compoziție farmaceutică sau mai multe dintre compozițiile farmaceutice, descrise în acest document se furnizează sub formă lichidă într-un recipient închis ermetic, de exemplu, un recipient care arată cantitatea și concentrația agentului. Așa cum se descrie în acest document, forma lichidă a compoziției administrate este furnizată într-un recipient închis ermetic de cel puțin 0,25 mg/mL, cel puțin 0,5 mg/mL, cel puțin 1 mg/mL, cel puțin 2,5 mg/mL, cel puțin 5 mg/mL, cel puțin 8 mg/mL, cel puțin 10 mg/mL, cel puțin 15 mg/mL, cel puțin 25 mg/mL, cel puțin 50 mg/mL, cel puțin 75 mg/mL, sau cel puțin 100 mg/mL de ADC. Forma lichidă poate fi depozitată la temperaturi între 2°C și 8°C în recipientul original.

Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile făcute cunoscute pot fi încorporate într-o compoziție farmaceutică adecvată pentru administrare parenterală. Soluția injectabilă poate fi compusă fie dintr-o formă de dozare lichidă, fie liofilizată într-un flacon din sticlă flint sau flacon din sticlă brună, ampulă, sau seringă preumplută, sau alt dispozitiv de livrare sau depozitare cunoscut.

Compozițiile descrise în acest document pot fi într-o varietate de forme. Acestea includ, pentru exemplificare, formele de dozare lichide, semi-solide, și solide, cum ar fi soluțiile lichide (de exemplu, soluțiile injectabile și perfuzabile), dispersiile sau suspensiile, tabletele, pastilele, pulberile, lipozomii, și supozitoarele. Forma preferată depinde de modul de administrare intenționat și de aplicația terapeutică.

Așa cum se descrie în acest document, tratamentul implică administrarea într-un singur bolus sau administrarea repetată a preparatului ADC prin intermediul unei rute de administrare acceptabile.

Pacienții pot fi evaluați pentru nivelurile de antigen țintă într-o probă dată (de exemplu, nivelurile de celule care exprimă antigenul țintă) pentru a ajuta la determinarea celui mai eficient regim de dozare, etc. O descriere cu titlu de exemplu este o metodă pentru a determina dacă un pacient va răspunde la tratamentul cu un ADC din prezenta descriere a invenției, cuprinzând furnizarea unei probe biologice de la pacient și punerea în contact a probei biologice cu ADC-ul. Probele biologice cu titlu de exemplu includ fluidul tisular sau corporal, cum ar fi un exsudat inflamator, sangele, serul, lichidul intestinal, proba de scaun, sau biopsia tumorală (de exemplu, o biopsie tumorală derivată de la un pacient care are sau prezintă riscul unui cancer care exprimă antigen țintă, de exemplu, un cancer care exprimă FRA, un cancer care exprimă her2, sau un cancer care exprimă MSLN). Așa cum se descrie în acest document, o probă (de exemplu, un fluid tisular și/sau corporal) poate fi obținută de la un subiect, și se poate utiliza o metodă imunologică adecvată pentru a detecta și/sau măsura exprimarea proteinei a antigenului țintă (de exemplu, FRA, her2, sau MSLN). Astfel de evaluări sunt utilizate, de asemenea, în scopuri de monitorizare pe tot parcursul terapiei, și sunt utile pentru a aprecia succesul terapeutic în combinație cu evaluarea altor parametri.

Așa cum se descrie în acest document, eficacitatea unui ADC poate fi evaluată prin punerea în contact a unei probe tumorale de la un subiect cu ADC și evaluarea ratei de creștere a tumorii sau evaluarea volumului tumorii. Așa cum se descrie în acest document, atunci când s-a determinat că un ADC este eficient, acesta poate fi administrat subiectului.

Abordările terapeutice de mai sus pot fi combinate cu oricare dintre o mare varietate de regimuri suplimentare chirurgicale, chimioterapice, sau radioterapice.

De asemenea, în acest document sunt făcute cunoscute utilizări ale unui ADC sau mai multora dintre ADC-urile făcute cunoscute la fabricarea unui medicament pentru tratarea cancerului, de exemplu, în conformitate cu metodele descrise mai sus. Așa cum se descrie în acest document, ADC-urile făcute cunoscute în acest document se utilizează pentru tratarea cancerului, de exemplu, în conformitate cu metodele descrise mai sus.

Așa cum se descrie în acest document, kiturile pentru utilizare în aplicațiile de laborator și terapeutice descrise în acest document sunt în sfera prezentei descrieri a invenției. Astfel de kituri pot cuprinde un transportor, un pachet, sau un container care este compartimentat pentru a primi unul sau mai multe recipiente, cum ar fi flacoane, tuburi, și altele asemenea, fiecare recipient (fiecare dintre recipiente) cuprinzând unul dintre elementele separate care urmează să fie utilizate într-o metodă făcută cunoscută în acest document, împreună cu o etichetă sau un insert care conține instrucțiuni de utilizare, cum ar fi o utilizare descrisă în acest document. Kiturile pot cuprinde un recipient care cuprinde o porțiune indivizibilă de medicament. Prezenta descriere a invenției descrie, de asemenea, un ADC sau mai mulți dintre ADC, sau compozițiile farmaceutice ale acestora, care sunt ambalate într-un recipient sigilat ermetic, cum ar fi o ampulă sau un pliculeț, indicând cantitatea de agent.

Kiturile pot cuprinde recipientul descris mai sus și unul sau mai multe alte recipiente asociate acestuia, care cuprind materiale dorite din punct de vedere comercial și din punctul de vedere al utilizatorului, inclusiv tampoane, diluanți, filtre, ace, seringi; etichete de transport, ambalaj, recipient, flacon și/sau tub care menționează conținutul și/sau instrucțiunile de utilizare, și inserturi de ambalaj cu instrucțiunile de utilizare.

O etichetă poate fi prezentă pe sau împreună cu recipientul pentru a indica faptul că compoziția este utilizată pentru o terapie specifică sau o aplicație non-terapeutică, cum ar fi o aplicație de prognostic, profilactică, de diagnostic, sau de laborator. O etichetă poate indica, de asemenea, direcții fie pentru utilizare *in vivo*, fie pentru utilizare *in vitro*, cum ar fi cele descrise în acest document. Direcțiile și alte informații pot fi incluse, de asemenea, pe un insert (inserturi) sau o etichetă (etichete), care este inclusă (sunt incluse) cu sau pe kit. Eticheta poate fi pe, sau asociată cu recipientul. O etichetă poate fi pe un recipient atunci când literele, numerele sau alte caractere care formează eticheta sunt turnate sau gravate în recipientul însuși. O etichetă poate fi asociată cu un recipient atunci când este prezentă în interiorul unui recipient sau suport care ține, de asemenea, recipientul, de exemplu, ca un insert de ambalaj. Eticheta poate indica faptul că compoziția este utilizată pentru diagnosticarea sau tratarea unei afecțiuni, cum ar fi un cancer descris în acest document.

EXEMPLUL 1

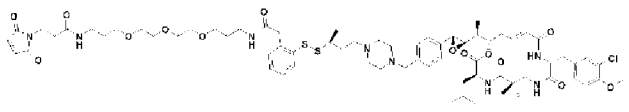
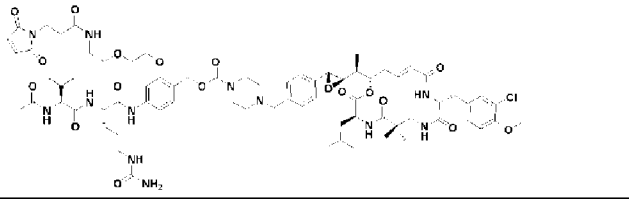
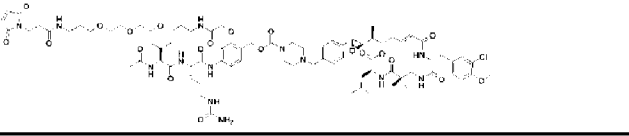
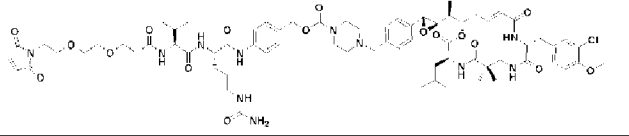
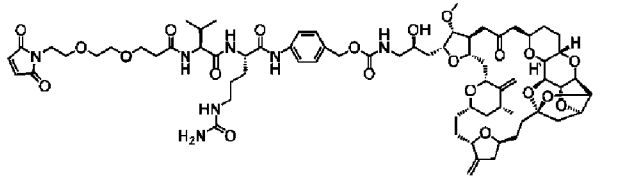
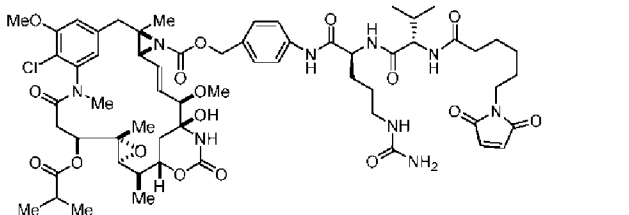
1. Materiale și metode

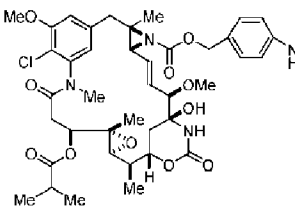
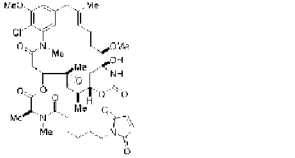
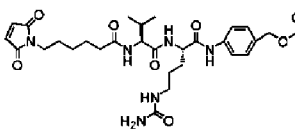
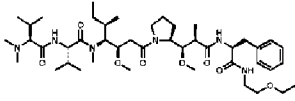
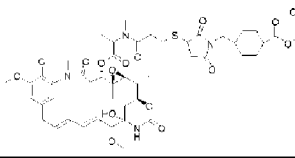
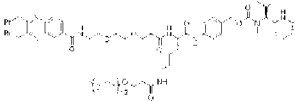
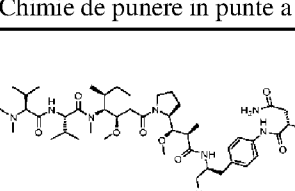
MORAb-003 utilizat pentru prepararea ADC-urilor a fost din lotul #AA0312.

1.1 Citotoxine

Structurile citotoxinelor care pot fi conjugate sunt prezentate în Tabelul 11.

Tabelul 11. Citotoxine conjugabile

Numele compusului	Linker	Citotoxină	Scindabilitate	Structură
PEG3-Bz-disulfidil-dimetil-criptoficină	maleimido-PEG3-Benzil-disulfidil-dimetil	criptoficină	da	
LL2-criptoficină	LL2	criptoficină	da	
LL3-criptoficină	LL3	criptoficină	da	
VCP-criptoficină	maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB	criptoficină	da	
VCP-cribulină (ER-001159569)	maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB	cribulină	da	
ER-001161318	maleimido-(CH ₂) ₅ -Val-Cit-pAB	ER-001150828 (aziridino-maitanzină- P3)	da	

Numele compusului	Linker	Citotoxină	Scindabilitate	Structură
ER-001161319	maleimido-PEG2-Val-Cit-pAB	ER-001150828 (aziridino-maitanzină- P3)	da	
ER-001159200	maleimido-(CH ₂) ₅	maitanzină DM1	nu	
M-MMAE	maleimido-(CH ₂) ₅ -Val-Cit-pAB	monometil auristatină E	da	
NHS-PEG2-AuF	NHS-PEG2	auristatină F	nu	
M-DM1	SMCC	maitanzină DM1	nu	
M-0285	PEG-pAB	duostatină 3	da	 Chimie de punere in punte a
M-0115	Asn-Ala	duostatină-5	da	

Numele compusului	Linker	Citotoxină	Scindabilitate	Structură
M-172	ciclohexil	duostatină 3	nu	Chimie de legare de disulfur
M-174	ciclohexil	duostatină 3	nu	Chimie de legare de disulfur
M-158	PEG-pAB	duostatină 10	da	Chimie de legare de disulfur
M-0384	PEG-tioeter	duostatină 14	nu	Chimie de legare de disulfur
M-0302	PEG-Asn	duostatină 14	nu	Chimie de legare de disulfur
M-292	PEG-Asn	duostatină 14	da	Chimie de legare de disulfur
M-0026	PEG	duostatină 14	da	Chimie de legare de disulfur
M-0267	PEG-tioeter	duomicină 7	nu	Chimie de legare de disulfur
M-0272	Asn-Ala	duomicină 7	da	Chimie de legare de disulfur
M-0260	PEG-pAB	duomicină 7	da	Chimie de legare de disulfur
M-0276	Asn-Ala	duomicină 7	da	Chimie de legare de disulfur
M-015-0913	ciclohexil	duostatină 3	nu	Utilizare limitată a lizinei
M-030-0132	PEG-pAB	duostatină 6	da	Utilizare limitată a lizinei
M-0161	ciclohexil	duostatină 10	nu	Utilizare limitată a lizinei
M-0157	PEG-pAB	duostatină 10	da	Utilizare limitată a lizinei
M-027-0381	tioeter	duostatină 14	nu	Utilizare limitată a lizinei
M-0025	PEG	duostatină 14	nu	Utilizare limitată a lizinei
M-0301	PEG-Asn	duostatină 14	nu	Utilizare limitată a lizinei
M-030-0011	PEG-pAB	duostatină 14	da	Utilizare limitată a lizinei
M-030-0291	PEG-Asn	duostatină 14	da	Utilizare limitată a lizinei
M-0114	PEG-pAB	duostatină-5	da	Chimie de punere în punte a
Abrevieri: Ala, alanină; Asn, asparagină; Cit, citrulină; NHS, N-hidroxisuccinimidă; pAB, p-aminobenziloxycarbo succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilat; Val, valină; VCP, Val-Cit-pAB.				

1.2 Conjugarea anticorp-medicament

1.2.1 Reducere parțială folosind TCEP

Condițiile de reducere parțială pentru MORAb-003 au fost stabilite prin varierea concentrației agentului reducător non-tiol tris(2-carboxietil)fosfină (TCEP), a concentrației de anticorp, și a timpului de reducere. MORAb-003 a fost schimbat în tampon în soluție salină tamponată cu fosfat Dulbecco (DPBS) conținând 1 mM acid etilendiaminătetraacetic (EDTA), apoi concentrat la 10 mg/mL folosind concentrarea centrifugă cu filtre de centrifugare cu prag de greutate moleculară (MWCO) de 10 kD. Anticorpii au fost diluați la concentrația corespunzătoare și s-a adăugat TCEP la concentrația finală indicată, și s-a amestecat ușor timp de 1 oră la temperatura camerei. TCEP a fost îndepărtat prin desalinizare utilizând coloane de desalinizare cu rotire Zeba™ de 5 sau 10 mL cu DPBS/1mM EDTA ca tampon (Thermo Fisher, MWCO de 40 kD), în conformitate cu protocolul producătorului. Probele au fost analizate pentru conținut de tiol liber folosind kitul de cuantificare fluorometrică a tiolului (Abeam), în conformitate cu protocolul producătorului. Pentru a determina amploarea și localizarea ruperii legăturii disulfură a fost efectuată analiza SDS-PAGE în condiții nereducătoare, așa cum este descris în secțiunea 1.3.3. În unele cazuri, MAb-urile desalinizate au fost aduse la 1-2 mg/mL prin diluare în DPBS și supuse biotinizării pentru a determina conjugabilitatea și raportul medicament-anticorp (DAR). La anticorp (mAb) se adaugă 10 mM maleimido-PEG2-biotină (Thermo Fisher) în dimetilsulfoxid (DMSO) la un raport molar de 10:1 și se incubează la temperatura camerei timp de 4 ore cu agitare ușoară. După conjugare, compusul care nu a reacționat a fost îndepărtat prin desalinizare utilizând coloane de desalinizare cu rotire Zeba™ (Thermo Fisher). Probele au fost apoi analizate prin LC-MS pentru determinarea DAR, așa cum este detaliat în secțiunea 1.3.4.

1.2.2 Conjugarea citotoxinei

Anticorpusul redus parțial a fost adus la 2,5 mg/mL în DPBS 0,5x, EDTA 0,5 mM, și amestecat bine. Co-solvenții organici, dacă sunt folosiți, au fost adăugați după aceea și amestecați bine. Co-solvenții examinați au fost propilen glicol (concentrație finală 20% și 50%), dimetilsulfoxid (DMSO) (10%), *N,N*-dimetilformamidă (20%), *N,N*-dimetilacetamidă (20%) și *N,N*-dimetilpropionamida (20%). Citotoxina modificată cu maleimido (stoc 6 mM în DMSO) a fost adăugată la anticorpi la un raport molar de 1:6 (mAb:compus) și amestecată bine. Conjugarea a continuat la temperatura camerei timp de 3,5 ore, cu amestecare ușoară. Propilen glicol 50% la 50% a fost ales ca modificatorul organic final și a fost utilizat în toate reacțiile de conjugare ulterioare.

1.2.3 Purificare

Anticorpusul conjugat a fost purificat folosind coloană (coloane) de desalinizare HiTrap® 26/10 (GE Healthcare) cu cromatografie efectuată cu o cromatografie lichidă cu proteină rapidă (FPLC) (GE Healthcare), pentru a îndepărta maleimido-citotoxina și propilen glicolul care nu au reacționat. ADC-urile MORAb-003, inclusiv MORAb-003-mal-VCP-eribulină (MORAb-202), au fost formulate în DPBS (tamponul de formulare a fost utilizat ca tampon de rulare în timpul cromatografiei FPLC).

1.3 Caracterizarea biofizică

1.3.1 Analiza BCA

Reactiv acid bicinconinic (BCA) preparat (200 μ L) a fost adăugat la 25 μ L de ADC-uri diluate în serie sau gamma globulină bovină (Thermo Fisher) 2 mg/mL standard, și probele au fost amestecate bine. Probele au fost incubate la 37°C timp de 20 min. Plăcile au fost citite la 595 nm pe un cititor de plăci SpectraMax® M5 (Molecular Devices). Datele au fost analizate folosind SoftMax® Pro (versiunea 3.2) cu un model de montare cu 4 parametri.

1.3.2 Analiza SEC-HPLC

Agregarea anticorpusului a fost analizată prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cu excluderea dimensiunii (SEC-HPLC), folosind un Agilent 1100. mAb a fost diluat la 1 mg/mL în DPBS. Anticorpusul (20 μ L) a fost injectat pe o coloană de siguranță TSKgel® SuperSW (4,6 mm x 3,5 cm, dimensiunea porilor de 4 μ m, Tosoh Bioscience), urmată de o coloană TSKgel® SuperSW3000 (4,6 mm x 30 cm, dimensiunea porilor de 4 μ m), eluat din coloană cu fosfat de sodiu 0,1 M conținând NaCl 0,15 M și NaN₃ 0,05%, la pH 7,4, la un debit de 0,3 mL/min timp de 20 min. Toate datele au fost analizate utilizând software Agilent ChemStation. Procentul de agregare a fost calculat ca $[PA_{\text{agregat}}/PA_{\text{total}}] \times 100$, unde PA = zona de varf integrată.

1.3.3 Analiza SDS-PAGE

Probe de proteine (0,1-10 μ g) au fost aduse la IX cu tampon de probă de dodecilsulfat de litiu (LDS). Pentru probele nereduse, incubarea a fost efectuată la temperatura camerei timp de 10 minute înainte de electroforeză. Pentru probele reduse, s-a adăugat ditiotritol (DTT) la o concentrație finală de 20 mM și probele au fost încălzite la 95°C timp de 10 min. și plasate pe gheață înainte de electroforeză. Probele au fost

încărcate pe geluri SDS-PAGE Bis-Tris cu 10, 12 sau 15 godeuri (Thermo Fisher) cu IX MOPS sau IX MES ca tampon de rulare. Electroforeza a fost efectuată la 185 V (tensiune constantă) timp de 1 oră. Gelurile au fost colorate cu soluție de colorare InstantBlue (Expedeon) și decolorate în apă. Documentarea a fost efectuată pe un sistem de documentare cu gel UltraLum folosind filtre portocalii de 600 nm.

1.3.4 Analiza UPLC/ESI-MS a raportului medicament-anticorp (DAR)

ADC-urile au fost deglicozilate folosind PNGaza F (New England BioLabs). La mAb (90 µL, 1 mg/mL în DPBS) s-au adăugat tampon G7 (10 µL) și PNGaza F (2 µL). Reacția a fost incubată într-un cuptor cu microunde Discover (CEM) timp de 2 cicluri: (1) puterea cuptorului cu microunde 10 W, 37°C, 10 min., urmată de o pauză de 5 min.; (2) putere cuptorului cu microunde 2 W, 37°C, 10 min. O porție din probă a fost redusă prin adăugare de DTT la o concentrație finală de 20 mM, urmată de incubare la 60°C timp de 3 min. Probele au fost apoi analizate folosind o cromatografie lichidă de ultra performanță (UPLC) Waters Acquity și spectrometru de masă Premier cu timp de zbor cvadrupol (Q-ToF). Probele (0,5 - 2 µg fiecare) au fost injectate pe o coloană de micro desalinizare MassPrep™ la 65°C, eluate din coloană cu o echilibrare de 5 min. în 95% din faza mobilă A, un gradient de 10 min. (5 - 90% B), și o re-echilibrare de 10 min. în 95% din faza mobilă A, la 0,05 mL/min. Faza mobilă A a fost acid formic 0,1% în apă. Faza mobilă B a fost acid formic 0,1% în acetonitril. Spectrometrul de masă Q-ToF a fost rulat în modul V, cu ion pozitiv, cu detectare în intervalul 500 - 4000 m/z. Parametrii sursei au fost după cum urmează: tensiunea capilară, 2,25 kV (anticorp intact) - 2,50 kV (anticorp redus); tensiunea conului de eșantionare, 65,0 V (anticorp intact) sau 50,0 V (anticorp redus); temperatura sursei, 100°C; temperatura de desolvatare, 250°C; debitul gazului de desolvatare, 550 L/oră. Vârful proteinei a fost supus deconvoluției utilizând funcția MassLynx® MaxEnt 1. Intensitățile relative ale maselor fiecărui lanț greu și ușor neconjugat, conjugate individual, și conjugat multiplu au fost combinate pentru a calcula DAR-ul general folosind formula:

$$2\left[\frac{I_{LC-1} + 2(I_{LC+2}) + 3(I_{LC+3}) + \dots n(I_{LC+n})}{\sum I_{LCtot}}\right] + 2\left[\frac{I_{HC-1} + 2(I_{HC+2}) + 3(I_{HC+3}) + \dots n(I_{HC+n})}{\sum I_{HCtot}}\right]$$

în care I_{LC+1} este intensitatea masei lanțului ușor conjugat cu o citotoxină, I_{LC+2} este intensitatea masei lanțului ușor conjugat cu două citotoxine, etc. I_{HC} sunt intensitățile de la lanțurile grele conjugate corespunzătoare și $\sum I_{LCtot}$ și $\sum I_{HCtot}$ sunt intensitățile combinate ale tuturor lanțurilor ușoare și lanțurilor grele neconjugate și conjugate, respectiv.

1.3.5 Analiza HIC-HPLC a DAR

În plus față de analiza DAR prin UPLC/analiza cu ionizare cu electropulverizare (ESI)-MS, DAR al MORAb-003-vcp-eribulină și DAR al MORAb-003-0285 au fost, de asemenea, analizate utilizând HPLC cu interacțiune hidrofobă (HIC-HPLC). Probele au fost injectate pe o TSKgel® Ether-5 PW, 7,5 mm ID x 7,5 cm, dimensiunea porilor de 10 µm, și eluate din coloană cu o echilibrare de 3 min. în 100% din faza mobilă A, un gradient de 15 min. (0-100 % B), o menținere de 5 min. în 100% B, o schimbare de 1 min. la 100% A și o re-echilibrare de 5 min. în 100% din faza mobilă A, la 0,7 mL/min. Faza mobilă A a fost fosfat de sodiu 25 mM, sulfat de amoniu 1,5 M, pH 7,0. Faza mobilă B a fost fosfat de sodiu 25 mM, izopropanol 25%, pH 7,0. Detectarea s-a făcut la 280 nm (referință 320 nm). DAR a fost determinat prin formula:

$$\left[\frac{AUC_{-1} + 2(AUC_{+2}) + 3(AUC_{-3}) + \dots n(AUC_{-n})}{\sum AUC_{tot}}\right]$$

în care AUC_{+1} este aria de sub curbă pentru vârful mAb corespunzător ADC conjugat cu o citotoxină, AUC_{+2} este aria de sub curbă pentru vârful mAb corespunzător ADC conjugat cu două citotoxine, etc. $\sum AUC_{tot}$ este aria de sub curbă combinată pentru toate vârfurile.

1.4 Analize de citotoxicitate

1.4.1 Analiza cu violet de gențiană

Celule IGROV1 (FR^{hi}) și SJSA-1 (FR^{neg}) au fost sub-cultivate și însămânțate la 10.000 de celule/godeu în mediu de creștere complet în plăci de cultură de țesut cu 96 de godeuri, incubate la 37°C, CO₂ 5% pe parcursul nopții (16 ore). De obicei, reactivii de test au fost diluați în serie 1:4 în plăci de diluare cu godeuri adânci de 2 mL, începând de la 1 µM (10 diluții în total). 100 µL din probele diluate s-au adăugat la plăcile de celule (concentrația inițială a probelor de test la 500 nM). Plăcile au fost incubate la 37°C, CO₂ 5% o perioadă suplimentară de 48 de ore. Mediul a fost aruncat, plăcile au fost spălate o dată cu 200 µL de DPBS, colorate cu 50 µL de soluție de violet de gențiană 0,2% la temperatura camerei timp de 15 min, și apoi spălate intens cu apă de la robinet. Plăcile au fost uscate la aer, și violet de gențiană a fost dizolvat cu 200 µL de

soluție SDS 1%. Plăcile au fost citite la 570 nm. Datele au fost analizate folosind GraphPad Prism 6. Analizele au fost efectuate utilizând o densitate de însămânțare de 1.000 de celule per godeu și expunerea la compus a fost pentru un total de 5 zile. Atunci când s-a dorit o expunere pe termen mai scurt, mediul conținând agenți citotoxici a fost îndepărtat după 4 ore și înlocuit cu mediu de creștere proaspăt înainte de incubarea de 5 zile. Pentru OVCAR3, CaOV3, și NCI-H2110, celulele au fost însămânțate la 3.000 de celule/godeu și incubate timp de 5 zile cu ADC. Pentru experimentele de concurență, ADC-urile titrate au fost pre-incubate cu 2 μ M (final) MORAb-003 neconjugat înainte de incubarea cu celule.

1.4.2 Analiza de ucidere a vecinătăților

Cu o zi înainte de începerea studiului, celule IGROV1 Nuclight™ Green (NLG) au fost însămânțate la 5.000 de celule/godeu în plăci cu 96 de godeuri cu fund rotund, după care a urmat centrifugare la 1.000 rpm timp de 3 min la temperatura camerei pentru a asigura formarea unui pelet de celule. Placa a fost plasată în vasul unui Incucyte Zoom® (EssenBioscience) și incubată la 37°C/CO₂ 5% pe parcursul nopții. Programul a fost configurat pentru a colecta imagini ale creșterii celulelor, și pentru a determina numărul total de celule colorate cu verde nuclear și celule colorate cu roșu nuclear, precum și confluența de fază a celulelor la fiecare două ore. În ziua experimentului, ADC MORAb-003 sau medicamentul liber a fost diluat în mediu RPMI complet și diluat în serie, începând de la 400 nM. 50 μ L de soluție de citotoxină s-au adăugat la celulele NLG-IGROV1 și incubat timp de 30 de min. În timpul perioadei de incubare, celulele HL-60 (FR^{neg}) Nuclight™ Red (NLR) au fost diluate la 2×10^5 , 1×10^5 sau 5×10^4 celule/mL cu medii proaspete. 50 μ L de suspensie celulară NLR-HL60 sau mediu singur s-au adăugat la godeurile NLG-IGROV1, după care a urmat centrifugare la 1.000 rpm timp de 3 min. la temperatura camerei pentru a asigura re-formarea peletului celular. Placa a fost plasată înapoi în vasul Incucyte Zoom (EssenBioscience) și incubată la 37°C/CO₂ 5% timp de până la 5 zile. Creșterea celulară relativă a NLG-IGROV1 a fost determinată prin comparație cu probele adăugate singure fără ADC sau libere de medicament folosind numărătoarea celulelor verzi. Creșterea celulară relativă a HL60 a fost făcută în mod similar, cu excepția faptului că s-a determinat numărul de celule roșii. Determinarea valorilor IC₅₀ atât pentru NLG-IGROV1, cât și pentru NLR-HL-60 a fost determinată folosind Prism (GraphPad).

1.4.3 Analiza stabilității în ser

20 μ L de ADC-uri MORAb-003 s-au amestecat bine cu 80 μ L de DPBS, ser uman reunit normal (Bioreclamation, Lot BRH552911), sau ser de șoarece reunit normal (Bioreclamation, Lot MSE152591), și incubat la 37°C timp de 0, 4, 24, și 48 de ore. După incubare, probele au fost înghețate și depozitate la -20°C până la evaluare în analize de citotoxicitate și legare. Pentru analizele de citotoxicitate, probele au fost evaluate pe celule IGROV1 și SJSA-1, așa cum este detaliat în secțiunea 1.4.1. Pentru evaluarea legării, probele au fost evaluate utilizând o analiză MSD ECL pe bază de soluție. Probele au fost incubate cu receptorul alfa al folatului biotinitat și sulfo-eticheta anti-MORAb-003 înainte de capturare pe o placă de streptavidină și detectate folosind electrochimiluminiscență cu un MSD Sector Imager 2400.

2. Rezultate

2.1 Prepararea ADC-urilor MORAb-003

Pentru a selecta cea mai bună combinație de linker și citotoxină pentru conjugare cu MORAb-003, ADC-urile au fost preparate folosind trei metodologii. În conformitate cu strategia de conjugare arătată în Figura 1, cisteinele neimperecheate sunt generate prin reducere parțială cu echivalenți molari limitați ai agentului reducător non-tiol TCEP. Această strategie reduce preferențial legăturile de disulfură inter-catenare care leagă lanțul ușor și lanțul greu (o pereche per împerechere H-L) și cele două lanțuri grele în regiunea balama (două perechi per împerechere H-H în cazul IgG1 umane), în timp ce lasă legăturile de disulfură intra-catenare intacte.

Cea de-a doua strategie de conjugare pentru prepararea ADC-urilor MORAb-003 a utilizat chimia de punere în punte a disulfurii reduse. Chimia de punere în punte a disulfurii reduse re-pune în punte tiolii liberi ai reziduurilor de cisteină eliberați în timpul procesului de reducere parțială, imitând rolul legăturii de disulfură și păstrând în acest fel stabilitatea și funcția ADC-ului.

A treia strategie de conjugare pentru prepararea ADC-urilor MORAb-003 a folosit utilizarea limitată a lizinei. Utilizarea limitată a lizinei are ca rezultat conjugarea unui număr foarte limitat al celor peste 70 de lizine expuse la solvent disponibile pe o moleculă IgG umană tipică, și poate permite potențial obținerea de amestecuri de produse ADC cu omogenitate mai mică în raport cu strategiile care implică modificarea cisteinei.

2.1.1 Prepararea VCP-eribulinei pentru ADC-uri MORAb-003

Eribulină (1) (10 mg, 14 μ mol) (Figura 2) a fost dizolvată în *N,N*-dimetilformamidă (DMF) (1 mL), și a fost amestecată bine. S-au adăugat *N,N*-diizopropiletilamină (bază Hunig sau *i*Pr₂NET) (3,6 μ L, 21 μ mol) și

Fmoc-Val-Cit-*para*-aminobenzil-*para*-nitrofenol (Fmoc-VCP-PNP) (**2**) (16 mg, 21 μ mol, Concortis Biosystems, cat. # VC1003). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 4 - 16 ore, monitorizat folosind un kit de testare a ninhidrinei (Anaspec, cat. # 25241) până când reacția a fost finalizată. La amestecul de reacție a fost apoi adăugată dietilamină (Et_2NH) (0,014 ml, 0,14 mmol), s-a agitat timp de 2 ore la 18 - 25°C pentru a îndepărta gruparea de protecție Fmoc. Reacția a fost monitorizată utilizând un kit de testare a ninhidrinei. La finalizare, solventul a fost evaporat sub vid pentru a permite obținerea VCP-eribulinei brute (**3**) (16 mg), purificat utilizând o coloană ZOBAX SB-C18 (dimensiunea porilor de 5 μ m, 9,4 x 150 mm) pe un sistem HPLC Waters Alliance e2695 în faza mobilă a $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ conținând acid formic 0,1%, printr-un gradient de 15 - 70% B. VCP-eribulina (**3**) (16 mg) a fost dizolvată în DMF (1 mL). S-au adăugat bază Hunig (7,2 μ L, 41 μ mol) și maleimido-PEG₂-NHS (**4**) (9,7 mg, 27 μ mol). Amestecul de reacție a fost agitat la 18 - 25°C timp de 3 ore. Amestecul de reacție a fost purificat prin HPLC ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$) conținând acid formic 0,1% printr-un gradient de 15 - 70% B. Solventul a fost îndepărtat prin liofilizare pentru a produce mal-(PEG)₂-Val-Cit-p-aminobenziloxycarbonil (pAB)-eribulină (mal-(PEG)₂-VCP-eribulină) (**5**).

2.1.2 Optimizarea condițiilor de reducere

ADC-urile MORAb-003 au fost preparate prin generarea de cisteine neimperecheate prin reducere parțială cu echivalenți molari limitați ai agentului de reducere non-tiol tris(2-carboxietil)fosfină (TCEP). A fost efectuată o cercetare inițială pe MORAb-003, prin care concentrația anticorpului, concentrația TCEP și timpul de incubare au fost variate, cu scopul de a genera o medie de 4 situsuri conjugabile per moleculă de anticorp. Numărul de situsuri de tiol liber a fost determinat utilizând o analiză de cuantificare a tiolului fluorometrică. Rezultatele acestei analize sunt arătate în Tabelul 12. Gradul de rupere a legăturilor H-H și H-L după o incubare de 10 min., 30 de min., 60 de min. sau 120 de min. a fost analizat, de asemenea, prin SDS-PAGE (Figura 3). Pentru această analiză, probe nereduse și reduse au fost încărcate pe un gel SDS-PAGE și electroforeza a fost efectuată la 185 V timp de 1 oră. În Figura 3, banda M corespunde standardului proteic. Banda 1 corespunde MORAb-003 netratat, neredus. Banda 2 corespunde MORAb-003 (5,3 mg/mL) redus în 70,6 μ M TCEP. Banda 3 corespunde MORAb-003 (5,3 mg/mL redus) în 141,2 μ M TCEP. Banda 4 corespunde MORAb-003 (1,5 mg/mL) redus în 20 μ M TCEP. Banda 5 corespunde MORAb-003 (1,5 mg/mL) redus în 40 μ M TCEP. Identitățile fiecărei benzi sunt indicate pe gelul din dreapta jos. "H" indică lanț greu, în timp ce "L" indică lanț ușor.

Tabelul 12. Optimizarea condițiilor de reducere pentru MORAb-003

		10 min		30 min		60 min		120 min	
Concentrația MORAb-003 μM (mg/ml)	Concentrația TCEP μM	Tiol liber μM	Legături de disulfură reduse per MAb	Tiol liber μM	Legături de disulfură reduse per MAb	Tiol liber μM	Legături de disulfură reduse per MAb	Tiol liber μM	Legături de disulfură reduse per MAb
35,3 (5,3)	70,6	215	3,0	247,5	3,5	297,6	4,2	266,8	3,8
35,3 (5,3)	141,2	339	4,8	372,8	5,3	384,2	5,4	479,8	6,8
10 (1,5)	20	13,3	0,7	14,7	0,7	15,2	0,8	14,6	0,7
10 (1,5)	40	21,8	1,1	25,6	1,3	26,9	1,3	27,4	1,4

Analiza SDS-PAGE și a conținutului de tiol a sugerat că incubarea de 60 min a mAb de 5,3 mg/ml la raport molar de 4 ori între TCEP și mAb a oferit un punct de plecare rezonabil, deoarece reducerea limitată a disulfurilor intramoleculare părea să fie prezentă (așa cum a fost determinat prin conținutul de tiol liber), și a rămas foarte puțin mAb neredus (mAb neredus ar acționa ca un inhibitor competitiv în studiile *in vitro* și *in vivo* folosind ADC-uri preparate). Au fost efectuate studii suplimentare cu MORAb-003 la concentrații de pornire de 5,0 mg/mL pentru a confirma acest raport molar optimizat între TCEP și mAb utilizând analiza SDS-PAGE (Figura 4). În Figura 4, banda 1 corespunde standardului proteic. Banda 2 corespunde MORAb-003 netratat, neredus. Banda 3 corespunde MORAb-003 tratat la un raport MORAb-003:TCEP de 1:1. Banda 4 corespunde MORAb-003 tratat la un raport MORAb-003:TCEP de 1:2. Banda 5 corespunde MORAb-003 tratat la un raport MORAb-003:TCEP de 1:3. Banda 6 corespunde MORAb-003 tratat la un raport MORAb-003:TCEP de 1:4. Conjugarea folosind maleimido-PEG2-biotină a fost efectuată, de asemenea, ulterior reducerii și îndepărtării TCEP, pentru a simula conjugarea citotoxinei pentru prepararea ADC. Analiza DAR a fost efectuată utilizând LC-MS. Rezultatele acestor studii sunt prezentate în Tabelul 13.

Tabelul 13. Optimizarea condițiilor de reducere pentru MORAb-003 - niveluri de conjugare cu maleimido-PEG2-biotină

TCEP		MORAb-003		
TCEP:mAb	TCEP (μM)	LC	HC	DAR
1	33,3	0,29	0,34	1,26
2	66,7	0,48	0,83	2,62
3	100	0,63	1,21	3,68
4	133,2	0,73	1,70	4,86

LC, nivelul lanțului ușor de biotină; HC, nivelul lanțului greu de biotină; DAR, biotină per mAb [DAR = 2(LC) + 2(HC)].

După conjugarea biotinei, analiza tiolului liber a indicat faptul că în MORAb-003-biotină nu a fost prezent tiol liber. Acest lucru a indicat faptul că, după reducerea legăturilor de disulfură, conjugarea a avut loc, în mod obișnuit, la ambii tioli generați, și că orice disulfuri reduse, neconjugate, au suferit o re-oxidare pentru a reforma legăturile de disulfură. Condițiile finale alese pentru reducere pentru generarea ADC au fost concentrație de anticorpi de 5,0 mg/mL, concentrație TCEP de 110 μM, și timp de incubare de 60 min. Acest lucru duce la un mAb cu un DAR de 4 după conjugare.

2.1.3 Optimizarea conjugării ADC

Deoarece prima citotoxină utilizată pentru prepararea ADC a fost criptoficina, care este un compus hidrofob, au fost efectuate experimente inițiale de optimizare a conjugării cu un anticorp anti-mezotelină umană "surogat" având două cisteine neîmperecheate disponibile pentru conjugare (una per lanț ușor) în locații specifice. Acest lucru facilitează foarte mult analiza eficienței de conjugare prin spectrometrie de masă, deoarece doar lanțul ușor trebuie să fie analizat. A fost efectuată titrarea propilen glicolului în timpul conjugării maleimido-LL3-criptoficinei cu anticorpii surogat, urmată de analiza eficienței de conjugare a lanțului ușor prin LC-MS (Tabelul 14).

Tabelul 14. Optimizarea concentrației de propilen glicol în reacția de conjugare

Propilen glicol (%)	LC Ab conjugat (%)
0	8%
20	48%
50	100%

Mase LC: neconjugat, 23536 Da; conjugat, 24367 Da.

50% propilen glicol a avut ca rezultat ocuparea deplină a situsurilor disponibile, și a fost aleasă drept concentrația finală care urmează să fie utilizată. După conjugare nu s-a observat nicio pierdere în legarea mAb (datele nu sunt reprezentate), indicând faptul că propilen glicolul nu a avut efecte dăunătoare asupra anticorpului. Prin urmare, condițiile de reacție de conjugare finale alese au fost 2,5 mg/mL mAb final, raport molar 6:1 pentru maleimido-linker-citotoxină:mAb în 0,5X DPBS (concentrație finală după adăugarea de propilen glicol), 0,5 mM EDTA, 50% propilen glicol, pH 7,2 timp de 3,5 - 4 ore la temperatura camerei. În aceste reacții, propilen glicolul este adăugat înainte de adăugarea maleimido-linker-citotoxinei.

2.1.4 Prepararea ADC-urilor și caracterizarea biofizică

Condițiile de reducere și conjugare stabilite, descrise în secțiunea 2.1.2, au fost folosite pentru a prepara primele 10 ADC-uri MORAb-003 enumerate în Tabelul 15. ADC-urile rămase au fost preparate fie prin punte de disulfură redusă, fie prin utilizarea limitată a lizinei, cu excepția M-MMAE și M-DM1. M-MMAE și M-DM1 au fost preparate de Concortis Biosystems, Inc., și au fost primite în forma conjugată.

Chimia de punere în punte a disulfurii reduse face punte peste tioli liberi produși în timpul procesului de reducere parțială, dând o citotoxină per disulfură redusă. În teorie, un anticorp având DAR = 4 ar avea disulfuri atât H-L cât și de balama repuse în punte, oferind un ADC cu stabilitate și omogenitate crescute față de abordările de conjugare tradiționale. Utilizarea limitată a lizinei are ca rezultat conjugarea unui număr foarte limitat al celor peste 70 de lizine expuse la solvent disponibile pe o moleculă IgG umană tipică. Conjugatii MORAb-003 preparați utilizând această metodă au avut ca rezultat un DAR de 2,0, sugerând că a fost utilizată o singură lizină per pereche H-L.

Toate ADC-urile au fost purificate prin cromatografie de desalinizare HiPrep 26/10 și formulate în DPBS. Analiza DAR a fost efectuată pe toate ADC-urile preparate prin LC-MS și nivelurile de agregare au fost determinate prin SEC-HPLC. Rezultatele acestor analize DAR și de agregare sunt enumerate în Tabelul 15 lângă ADC-ul respectiv.

Tabelul 15. Analize biofizice ale ADC-urilor MORAb-003

	Numele compusului	DAR	Agregare (%)
1	PEG3-Bz-disulfidil-dimetil-criptoficină	3,7 - 3,9	29
2	LL2-criptoficină	3,2	18 - 36
3	LL3-criptoficină	3,2 - 3,7	22 - 36
4	VCP-criptoficină	3,4	50
5	VCP-eribulină	3,6	0 - 2,6
6	ER-001161318	3,5	3,2
7	ER-001161319	3,5	3,1
8	ER-001159200	2,8	
9	M-MMAE	4,0	2
10	NHS-PEG2-AuF	5,0	
11	M-DM1	3,6	1,8
12	M-0285	4,0	1,2
13	M-0115	4,0	0,4
14	M-172	3,1	3,6
15	M-174	2,8	4,4
16	M-158	4,5	3,8
17	M-0384	4,2	4,2
18	M-0302	4,3	3,3
19	M-292	4,0	4,5
20	M-0026	4,2	3,3
21	M-0267	4,0	2,9
22	M-0272	3,3	1,5
23	M-0260	3,2	1
24	M-0276	4,6	6,2
25	M-015-0913	2,0	< 1
26	M-030-0132	2,0	< 1
27	M-0161	2,1	2,4
28	M-0157	2,0	< 1

	Numele compusului	DAR	Agregare (%)
29	M-027-0381	2,0	< 1
30	M-0025	2,0	1,7
31	M-0301	2,0	1,4
32	M-030-0011	2,0	< 1
33	M-030-0291	2,0	<1
34	M-0255	3,6	5,9
35	M-0114	4,0	3,9

Valorile DAR pentru toate ADC-urile au fost în intervalul predeterminat (DAR între 3 și 4). Nivelurile agregate pentru ADC-urile pe bază de criptoficină au fost semnificativ mai mari decât cele dorite (> 10%), în timp ce maleimido-linker-citotoxinele pe bază de eribulină (VCP-eribulină) și pe bază de maitansină (ER-001161318, ER-001161319, și M-MMAE) au demonstrat, toate, niveluri agregate acceptabile. O cercetare asupra altor co-solvenți organici a fost efectuată pe reacții de conjugare la MORAb-003 folosind VCP-criptoficină. Co-solvenții testați au fost DMSO (10%), *N,N*-dimetilformamidă (20%), *N,N*-dimetilacetamidă (20%), și *N,N*-dimetilpropionamidă (20%). Nivelurile agregate după conjugare folosind acești co-solvenți au fost, toate, egale cu, sau mai mari de, 50% propilen glicol.

O analiză SDS-PAGE non-reducătoare a fost efectuată pe un subset de ADC-uri (Figura 5). Deoarece DAR pentru toate aceste ADC-uri a fost determinat a fi 4, s-a crezut că aceste ADC-uri ar trebui să migreze ca IgG intactă de ~ 160 kD, deoarece ambele disulfuri H-L, și ambele disulfuri balama ar trebui să fie repuse în punte. Acest subset de ADC-uri a inclus M-MMAE (banda 2), M-DM1 (banda 3), M-0026 (banda 4), M-0260 (banda 5), M-0267 (banda 6), M-0272 (banda 7), M-0285 (banda 8), M-292 (banda 9), M-027-0381 (banda 10), și M-0384 (banda 11) (Figura 5). În Figura 5, banda 1 corespunde standardului proteic.

Din această analiză reiese clar că, pentru ADC-urile cu chimie de punere în punte a disulfurii reduse (benzile 4 - 9, 11), există specii monovalente H-L semnificative (80 kD), în plus față de ADC intact. Acest lucru indică faptul că există o punere în punte a disulfurii balama intra-catenare semnificativă, în plus față de punerea în punte balama inter-catenară. Analiza SEC-HPLC indică faptul că ADC-urile migrează ca o singură IgG intactă, indicând faptul că pentru acele ADC-uri cu punere în punte H-H intra-catenare, lanțurile grele sunt asociate non-covalent în ADC-ul final.

2.2 Analiză de potență *in vitro* ale ADC-urilor MORAb-003

2.2.1 Citotoxicitatea pe celulele IGROV1 și SJSA-1

Potența *in vitro* a ADC-urilor preparate a fost evaluată folosind o analiză cu violet de gențiană, așa cum este detaliat în secțiunea 1.4.1.

Screening-ul inițial al tuturor ADC-urilor MORAb-003 a fost efectuat pe celule **IGROV1** (FR^{hi(+++)}) și SJSA-1 (FR^{neg(-)}). Celulele **IGROV1** au ca origine carcinomul epitelial ovarian uman și exprimă niveluri ridicate ale receptorului alfa al folatului (FR), antigenul țintă al MORAb-003. Celulele SJSA-1 sunt o linie de celule tumorale de osteosarcom uman care sunt negative pentru receptorul alfa al folatului. Screening-ul ADC-urilor selectate a fost efectuat, de asemenea, în celule CaOV3 (carcinom ovarian uman, FR^{med(+++)}), NCI-H2110 (carcinom pulmonar cu celule non-mici uman, FR^{med(+++)}), și/sau OVCAR3 (carcinom ovarian uman, FR^{med(+++)}). Rezultatele acestui screening sunt furnizate în Tabelul 16.

Tabelul 16. Screening-ul de citotoxicitate (IC₅₀) al ADC-urilor MORAb-003 pe diferite linii de celule tumorale

Numele compusului	IGROV1	SJSA-1	CaOV3	NCI-H2110	OVCAR3
PEG3-Bz-disulfidyl-dimetil-criptoficină	0,067	0,41			
LL2-criptoficină	0,023	4,7	0,33		
LL3-criptoficină	0,086	12,7	0,19		0,094
VCP-criptoficină	0,03	□ 100	0,02		
VCP-eribulină	0,054	> 100	3,7	0,73	0,16
ER-001161318	0,26	> 100	3,1		
ER-001161319	0,49	> 100	11,3		

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

97

Numele compusului	IGROV1	SJSA-1	CaOV3	NCI-H2110	OVCAR3
ER-001159200	6,5	> 100	9,2		
M-MMAE	0,2	253			
NHS-PEG2-AuF	0,2	> 500			
M-DM1	55	132			
M-0285	0,3	> 100		14	8,8
M-0115	0,54	> 100			
M-172	> 500	> 500			
M-174	> 500	> 500			
M-158	> 500	> 500			
M-0384	2,25	2,45			
M-0302	330	> 500			
M-292	1,7	> 500			
M-0026	1,38	540			
M-0267	0,029	0,028			
M-0272	0,252	1,02			
M-0260	0,383	0,036			
M-0276	0,43	30			
M-015-0913	> 500	> 500			
M-030-0132	> 500	17,3			
M-0161	> 500	> 500			
M-0157	> 500	> 500			
M-027-0381	14,5	28			
M-0025	> 500	> 500			
M-0301	> 500	> 500			
M-030-0011	61,6	> 500			
M-030-0291	> 500	105			
M-0255	0,12	0,46			
M-0114	144	> 100			
Toate valorile sunt IC ₅₀ in nM, și sunt valori medii ale experimentelor replicate, atunci când au fost efectuate.					

ADC VCP-eribulină a fost potent (54 pM) pe celulele IGROV1 și a avut ucidere puțină asupra celulelor SJSA-1. Pentru aceste linii de celule, ADC-ul VCP-eribulină a demonstrat potență și specificitate mai mare în raport cu ADC-urile cu valori DAR echivalente, cum ar fi M-MMAE și M-DM1. ADC VCP-eribulină a demonstrat, de asemenea, citotoxicitate puternică pe liniile de celule tumorale care exprimă FR suplimentare de origine ovariană (CaOV3 și OVCAR3) și care au ca origine carcinomul pulmonar cu celule non-mici (NC-H2110).

ADC-urile VCP-eribulină, LL2-criptoficină, LL3-criptoficină, VCP-criptoficină, ER-001161318, ER-001161319, și ER-001159200 au afișat citotoxicitate specifică (> 2-log de specificitate) în celulele CaOV3 (FR^{med(++)}). Un număr din aceste ADC-uri a prezentat o potență sub-nanomolară. Conjugatii de criptoficină au demonstrat, de asemenea, niveluri ridicate de potență (23 pM - 86 pM) în celulele IGROV1, dar, cu excepția VCP-criptoficinei, au demonstrat, de asemenea, citotoxicitate măsurabilă pe celulele SJSA-1. Conjugatii de maitansină care pot fi scindați ER-001161318 și ER-001161319 au avut o potență intermediară pe IGROV1 (0,26 nM și 0,49 nM), și ucidere puțină departe de țintă a celulelor SJSA-1.

Toți conjugajii de utilizare limitată a lizinei nu au demonstrat nicio specificitate și nu au fost evaluați în continuare. Conjugajii care pot fi scindați care utilizează tehnologia de punere în punte a disulfurii reduse a duostatinei-3 (M-0285), duostatinei-5 (M-0115) și duostatinei-14 (M-292 și M-0026) au demonstrat, toți, citotoxicitate specifică pe linia de celule IGROV1, cu citotoxicitate mică pe linia de celule SJSA-1. Conjugajii de duostatină-3 și duostatină-5, derivați de auristatină, au fost ușor mai mari în potență decât conjugajii de duostatină-14, care este un derivat al maitansinei. Potențele și specificitățile au fost comparabile cu conjugatul M-MMAE de control, care folosește un linker Val-Cit-pAB (VCP) atașat la monometil E. Conjugajii cu chimie de disulfură redusă care nu pot fi scindați, au fost, toți, lipsiți fie de potență, fie de specificitate suficientă, și nu au fost analizați în continuare.

2.2.2 Citotoxicitatea pe linia de celule de cancer ovarian CaOV3 care exprimă receptorul folatului uman

Potența ADC-urilor MORAb-003 selectate a fost determinată, de asemenea, pe liniile de celule de tumoră ovariană umană OVCAR3 și CaOV3, precum și pe linia de celule de NSCLC uman NCI-H2110 (Tabelul 16). Pe linia celulară ovariană umană CaOV3, conjugajii de criptoficină au demonstrat potență mai mare măsurabilă decât conjugatul VCP-eribulină, spre deosebire de cea observată în celulele IGROV1. Acest lucru se poate datora nivelului de exprimare mai mic al receptorului alfa al folatului pe celulele CaOV3 în comparație cu IGROV1, sau potenței mai mari a criptoficinei pe aceste celule, în comparație cu eribulina. Conjugajii pe bază de maitansină ER-001161318, ER-001161319 și ER-001159200 au avut, toți, potențe similare cu, sau mai mici decât VCP-eribulină.

2.3 Uciderea vecinătăților a VCP-eribulină, ER-001161318 și M-0285

Pentru a evalua activitatea de ucidere a vecinătăților a fost stabilită o analiză, folosind două linii de celule marcate. În această analiză, celule IGROV1 (FR^{hi}) marcate cu Nuclight™ Green și HL-60 (FR^{neg}) marcate cu Nuclight™ Red au fost co-cultivate în diferite rapoarte ale numărului de celule, și au fost tratate cu titrări ale ADC-urilor MORAb-003 VCP-eribulină, ER-001161318 sau M-0285. VCP-eribulina este un ADC pe bază de eribulină care cuprinde un linker care poate fi scindat maleimido-PEG₂-Val-Cit-pAB, în timp ce ER-001161318 este ADC pe bază de maitansină care cuprinde un linker care poate fi scindat maleimido-(CH₂)₅-Val-Cit-pAB și M-0285 este un ADC pe bază de duostatină care cuprinde un linker care poate fi scindat PEG-pAB. Citotoxicitatea a fost monitorizată cu un sistem de imagistică de celule Incucyte Zoom®. Rezultatele acestei analize de citotoxicitate a vecinătăților sunt arătate în Tabelul 17 și în Figurile 6A-C.

Tabelul 17. Activitatea de ucidere a vecinătăților a VCP-eribulină pe co-cultura de linii de celule FR-pozitive și FR-negative

EC ₅₀ (nM)			
IGROV-1	HL-60	HL-60 (co-cultură cu IGROV-1)	HL-60 (eribulină)
0,0005972	39,74	0,2399	0,1702

Atunci când celulele HL-60 (FR^{neg}) au fost cultivate la un raport de 2:1 față de celulele IGROV1 (FR^{hi}), tratamentul cu MORAb003-VCP-eribulină a avut ca rezultat o creștere de 2-log a uciderii celulelor HL-60, în comparație cu celulele HL-60 singure (Tabelul 17 și Figura 6A). Aceste date sugerează că celulele țintă-negative ale receptorului alfa al folatului (FR) sunt ucise mai eficient de MORAb003-VCP-eribulină atunci când sunt co-cultivate cu celule FR țintă-pozitive, menționată în acest document ca uciderea vecinătăților. Uciderea vecinătăților se distinge de uciderea departe de țintă, care este definită ca uciderea celulelor țintă-negative pe cont propriu, în absența și independent de co-cultivarea cu celule țintă-pozitive. Creșterea observată a uciderii vecinătăților a fost, de asemenea, aproape identică cu creșterea observată după tratamentul celulelor HL-60 cu eribulină liberă, indicând un mecanism potențial pentru efectul asupra vecinătăților. Fără a dori să fie legat de nicio teorie, MORAb003-VCP-eribulină poate fi scindat în, sau în apropierea celulelor IGROV1 FR-pozitive, care suferă, de asemenea, apoptoză și eliberează eribulină liberă în cultură. Citotoxina eliberată poate ucide celulele HL-60 FR-negative.

În schimb, pentru MORAb003-ER-001161318 a fost observată doar o ușoară deplasare (Figura 6B), și cu MORAb003-0285 nu a fost observată nicio deplasare (Figura 6C). Atunci când raportul HL-60:IGROV1 a fost micșorat de la 2:1 la 1:2 s-a observat uciderea măsurabilă a celulelor HL-60 relativ la celulele HL-60 singure, pentru MORAb003-ER-001161318, în timp ce efectul asupra vecinătăților a rămas totuși scăzut, cu toate că detectabil, pentru MORAb003-0285. Aceste date sugerează că, în ceea ce privește uciderea vecinătăților, ADC-urile MORAb-003 evaluate pot fi clasificate ca VCP-eribulină > ER-001161318 > M-0285.

2.4 Analiza de stabilitate in ser

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

99

Având în vedere timpul de înjumătățire circulant lung *in vivo* al ADC-urilor și potențialul de toxicitate dacă citotoxinele sunt eliberate în circulație, ADC-urile trebuie să demonstreze stabilitate în ser. ADC-urile MORAb-003 VCP-eribulină, ER-001161319, și M-0285 au fost preincubate în ser uman sau de șoarece la 37°C timp de până la 48 de ore, apoi au fost evaluate într-o analiză de citotoxicitate cu celule IGROV1 și SJSA-1. ER-001161319 este ADC pe bază de maitansină care cuprinde același linker care poate fi scindat ca VCP-eribulină, maleimido-PEG₂-Val-Cit-pAB. Au fost incluse controale PBS și serice pentru a corecta orice efecte serice asupra performanței analizei. Rezultatele acestui studiu sunt arătate în Tabelul 18.

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

100

Tabelul 18. Stabilitatea in ser a ADC-urilor MORAb-003 selectate

[illegible]

În timp ce VCP-eribulină și M-0285 au fost stabili timp de cel puțin 48 de ore în oricare seruri, ER-001161319 a demonstrat o scădere semnificativă a potenței după 48 de ore. Acest lucru se poate datora legăturii aziridino-carbamate cu maitansina, care nu a fost descrisă anterior în literatura de specialitate. Forma compusului eliberat poate să nu fie foarte potentă, deoarece nu s-a observat nicio creștere a citotoxicității pe celulele SJSA-1.

2.5 Studii *in vitro* cu MORAb003-VCP-eribulină

2.5.1 Analiza HIC-HPLC a DAR și a eterogenității produsului

MORAb003-VCP-eribulină și MORAb003-0285 au fost analizați prin HIC-HPLC pentru a evalua DAR printr-o metodă alternativă și de a examina eterogenitatea produsului și conținutul de anticorp neconjugat (concurrent). S-a dovedit că MORAb003-VCP-eribulină are specii DAR de 0, 2, 4, și 6, ceea ce este în concordanță cu metoda utilizată pentru reducere și conjugare (Figura 7A). Au fost observate cantități foarte mici de specie cu DAR = 0. DAR global, pe baza calculelor AUC, a fost de 3,80, în concordanță cu valorile determinate prin LC-MS. MORAb003-0285 a migrat ca un singur varf prin HIC-HPLC, indicând o singură specie DAR (Figura 7B). Aceasta a fost atribuită ca DAR 4,0.

2.5.2 Specificitate prin analiza concurenței

Specificitatea la antigen a citotoxicității MORAb-003-VCP-eribulină a fost demonstrată pentru conjugatul VCP-eribulină utilizând un format de analiză a concurenței (Figura 8). În acest experiment, titrările MORAb-003-VCP-eribulină (concentrația inițială de 100 nM) au fost co-incubate cu 2 μ M MORAb-003 neconjugat. MORAb-003 neconjugat a furnizat o deplasare de 2-log a potenței pe celule IGROV1, similară cu rezultatele obținute cu IMGN853, ADC-ul anti-receptorul alfa al folatului uman-maitansină de la Immunogen, acum în studii clinice de fază II, pe celule KB (Moore și colab., Reuniunea anuală a American Society of Clinical Oncology (ASCO) din 2015, rezumatul 5518).

2.5.3 Citotoxicitate pe celulele NSCLC NCI-H2110

Folosind o analiză cu violet de gențiană a fost efectuată citotoxicitatea atât pentru MORAb003-VCP-eribulină, cât și pentru MORAb003-0285 pe linia de celule de NSCLC uman NCI-H2110. Rezultatele acestei analize sunt arătate în Tabelul 16. MORAb003-VCP-eribulină a avut o IC_{50} de 0,73 nM, în timp ce MORAb003-0285 a avut o IC_{50} de 14 nM.

2.6 Studii *in vivo*

2.6.1 Doza maximă tolerată (MTD) de MORAb-003-VCP-eribulină (MORAb-202) în tulpina de șoarece CD-1

Șoareci CD-1 naivi au fost injectați intravenos cu 200 μ L de MORAb-202 în conformitate cu planificarea din Tabelul 19. Greutatea corporală a fost măsurată înainte de doză în ziua de dozare, după 24 de ore de la doză, și de trei ori pe săptămână după aceea. Animalele au fost observate pentru bunăstare clinică pe toată durata studiului. După două săptămâni de la dozare, greutatea corporală terminală a fost măsurată și înregistrată. Șoarecii eutanasiați la sfârșitul studiului (și dacă vreun șoarece a fost eutanasiat sau găsit mort în timpul studiului) au fost prelucrați pentru necropsie. Organele au fost examinate pentru semne de deteriorare a țesuturilor.

Tabelul 19. Conceptul studiului

Grup	# Șoareci	Tratament	Doză (mg/kg)	Regim	Rută
1	3	Vehicul*	0	bolus unic	i.v.
2		MORAb-202	10		
3			20		
4			40		
5			80		

În oricare dintre grupurile de tratament nu a fost observată nicio pierdere semnificativă de greutate corporală în comparație cu grupul de control tratat cu PBS, sau orice constatări clinice care să indice toxicitate în timpul tratamentului. Greutatea corporală a șoarecilor individuali este arătată în Tabelul 20, iar media grupului și SEM sunt arătate în Tabelul 21. Cinetica schimbării greutății corporale pentru fiecare grup (media grupului și SEM) sunt arătate în Figura 9. MORAb-202 la doze de până la 80 mg/kg prin intermediul administrării intravenoase în bolus nu a produs toxicitate. Prin urmare, MTD este peste 80 mg/kg.

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

102

Tabelul 20

Zile după Rx	control PBS			MORAb-202 10 mg/kg			MORAb-202 20 mg/kg			MORAb-202 40 mg/kg			MORAb-202 80 mg/kg		
X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2	B:Y3	C:Y1	C:Y2	C:Y3	D:Y1	D:Y2	D:Y3	E:Y1	E:Y2	E:Y3
0	22,50	20,60	21,20	22,60	23,50	21,80	27,40	26,20	21,00	23,80	23,30	21,70	21,80	26,50	25,80
1	23,60	21,50	22,00	22,80	23,80	23,00	28,80	27,50	21,40	23,60	23,50	21,60	23,10	27,80	27,80
2	23,30	21,90	22,00	23,30	24,00	22,90	29,30	29,00	22,10	23,60	24,60	21,80	23,30	28,30	28,30
4	23,30	21,90	22,00	23,30	23,90	23,30	30,20	31,00	23,00	24,40	24,10	22,70	23,50	29,50	28,60
7	23,90	23,10	22,70	24,80	25,20	24,90	29,60	32,00	24,00	25,10	25,50	23,40	23,30	30,40	30,10
9	24,60	22,50	22,80	24,90	25,30	25,00	30,80	31,70	23,40	25,80	25,20	23,70	23,60	31,00	30,20
11	24,20	23,40	23,20	24,30	25,10	24,30	31,00	32,40	23,80	25,30	25,00	23,80	23,10	29,10	29,40
14	24,00	23,50	24,40	25,80	25,60	25,70	33,20	32,40	24,10	25,70	25,30	26,30	21,70	28,40	28,90

Tabelul 21

zile după injecții	PBS			MORAb-202 10 mg/kg			MORAb-202 20mg/kg			MORAb-202 40mg/kg		
	media (g)	sem	n	media (g)	sem	n	media (g)	sem	n	media	media (g)	n
0	21,4	0,6	3	22,6	0,5	3	24,9	2,0	3	22,9	0,6	3
1	22,4	0,6	3	23,2	0,3	3	25,9	2,3	3	22,9	0,7	3
2	22,4	0,5	3	23,4	0,3	3	26,8	2,4	3	23,3	0,8	3
4	22,4	0,5	3	23,5	0,2	3	28,1	2,5	3	23,7	0,5	3
7	23,2	0,4	3	25,0	0,1	3	28,5	2,4	3	24,7	0,6	3
9	23,3	0,7	3	25,1	0,1	3	28,6	2,6	3	24,9	0,6	3
11	23,6	0,3	3	24,6	0,3	3	29,1	2,7	3	24,7	0,5	3
14	24,0	0,3	3	25,7	0,1	3	29,9	2,9	3	25,8	0,3	3

2.6.2 Doza maximă tolerată de eribulină la șoarecii CD-1

Șoareci CD-1 naivi au fost injectați intravenos cu 200 μ L de eribulină în conformitate cu planificarea din Tabelul 22. Greutatea corporală a fost măsurată de trei ori pe săptămână, inclusiv înainte de doză în fiecare zi de dozare și după 24 de ore de la fiecare doză. Animalele au fost observate pentru bunăstare clinică pe toată durata studiului (două săptămâni după ultima doză). Greutatea corporală terminală a fost măsurată și înregistrată. Șoarecii eutanasiați la sfârșitul studiului (și dacă vreun șoarece a fost eutanasiat sau găsit mort în timpul studiului) au fost prelucrați pentru necropsie. Organele au fost examinate pentru semne de deteriorare a țesuturilor.

Tabelul 22. Conceptul studiului

Grup	# Șoareci	Tratament	Doză (mg/kg)	Regim	Rută
1	3	PBS	0	q4dx3	i.v.
2		Eribulină	0,4		
3			0,8		
4			1,6		
5			3,2		

Nu au fost observate pierderi semnificative de greutate corporală sau constatări clinice care să indice toxicitate la animalele cărora li s-a administrat eribulină la doze de până la 1,6 mg/kg, utilizând regimul de dozare q4dx3 (o dată la fiecare patru zile pentru 3 doze în total). Administrarea a 3,2 mg/kg cu aceeași planificare a indus piloerecția la toți cei trei șoareci după cea de-a doua doză. S-a observat o scădere severă în greutate (23% scădere la un șoarece, #552, după cea de-a doua doză; 17% și 8% în rest, #551 și #552, după cea de-a treia doză), în comparație cu controlul tratat cu PBS. Nu s-au observat modificări grosolane în organele șoarecilor în timpul necropsiei. Greutatea corporală a șoarecilor individuali este arătată în Tabelul 23, iar media grupului și SEM sunt arătate în Tabelul 24. Cinetica schimbării greutății corporale pentru fiecare grup (media grupului și SEM) sunt arătate în Figura 10.

Eribulina la doze de până la 1,6 mg/kg, utilizând regimul de dozare q4dx3, nu a produs toxicitate, în timp ce 3,2 mg/kg a indus o scădere severă în greutate. Prin urmare, MTD a eribulinei, în acest studiu, este de 1,6 mg/kg, q4dx3.

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

105

Tabelul 23

Ziua	PBS			eribulină 0,4 mg/kg			eribulină 0,8 mg/kg			eribulină 1,6 mg/kg			eribulină 3,2 mg/kg		
X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2	B:Y3	C:Y1	C:Y2	C:Y3	D:Y1	D:Y2	D:Y3	E:Y1	E:Y2	E:Y3
0	26,50	24,40	23,40	22,40	24,60	23,10	23,90	25,50	25,10	21,90	24,40	23,70	24,30	25,00	22,00
1	28,13	25,11	24,36	21,84	24,02	22,43	23,03	23,60	24,46	21,13	24,10	24,15	22,31	23,47	20,57
4	25,60	25,10	24,40	22,70	24,00	24,00	23,80	24,40	24,50	21,70	24,10	23,30	20,90	22,20	17,50
5	26,40	24,80	24,50	22,30	24,10	23,40	24,10	24,00	24,80	21,50	24,50	24,10	20,90	22,70	16,90
8	27,50	25,70	24,50	23,30	23,70	25,20	24,00	24,80	25,90	21,90	24,50	24,20	21,80	23,90	9003,00*
9	27,50	25,50	24,40	22,90	23,40	25,40	24,00	24,70	25,30	21,80	24,80	24,30	20,20	23,00	
11	27,50	25,60	24,40	22,60	23,90	25,60	24,70	25,10	26,00	22,20	25,70	24,70	20,00	23,30	
13	27,40	26,80	25,40	23,70	23,93	26,50	25,30	25,60	26,60	22,80	25,80	25,20	21,40	23,70	
16	27,30	26,80	26,20	24,70	24,10	26,70	25,40	25,80	26,40	23,40	26,70	26,10	23,60	24,30	
18	27,00	27,40	27,30	24,30	24,90	27,90	26,20	28,00	27,90	24,70	27,90	26,20	25,90	25,90	
20	28,10	27,60	26,50	26,10	25,70	28,50	25,40	28,20	28,10	25,40	29,00	26,00	26,80	26,00	

Fiecare coloană reprezintă un animal individual.

*9003: eutanasiat pentru pierdere în greutate > 20%.

Tabelul 24

zile după injecții	PBS			eribulină 0,4 mg/kg			eribulină 0,8 mg/kg			eribulină 1,6 mg/kg	
	media (g)	sem	n	media (g)	sem	n	media (g)	sem	n	media	media (g)
0	24,8	0,9	3	23,4	0,6	3	24,8	0,5	3	23,3	0,7
1	25,9	1,2	3	22,8	0,7	3	23,7	0,4	3	23,1	1,0
4	25,0	0,3	3	23,6	0,4	3	24,2	0,2	3	23,0	0,7
5	25,2	0,6	3	23,3	0,5	3	24,3	0,3	3	23,4	0,9
8	25,9	0,9	3	24,1	0,6	3	24,9	0,6	3	23,5	0,8
9	25,8	0,9	3	23,9	0,8	3	24,7	0,4	3	23,6	0,9
11	25,8	0,9	3	24,0	0,9	3	25,3	0,4	3	24,2	1,0
13	26,5	0,6	3	24,7	0,9	3	25,8	0,4	3	24,6	0,9
16	26,8	0,3	3	25,2	0,8	3	25,9	0,3	3	25,4	1,0
18	27,2	0,1	3	25,7	1,1	3	27,4	0,6	3	26,3	0,9
20	27,4	0,5	3	26,8	0,9	3	27,2	0,9	3	26,8	1,1

2.6.3 Evaluarea dozei eficiente minime de MORAb003-VCP-eribulină (MORAb-202) în modelul de hNSCLC NCI-H2110 la șoareci CB17-SCID

Celule de NSCLC uman, NCI-H2110, pasajul 47 au fost implantate subcutanat la 30 de șoareci CB17 SCID (de sex feminin, cu vârsta de 5 până la 6 săptămâni, cântărind 20 de grame). După 14 zile de la implantare, șoarecii au fost randomizați în cinci grupuri. Volumul mediu al tumorii în fiecare grup în ziua tratamentului (Ziua 0) a variat între 154 - 175 mm³ (Tabelul 27). Șoarecii înrolați au fost tratați cu MORAb003-VCP-eribulină (MORAb-202) (Lot # NB2900-87E 10/07/15) la 1, 2,5 sau 5 mg/kg, cu MORAb-003-0285 (Lot # 042-150-002) drept control la 5 mg/kg, sau cu PBS, în conformitate cu conceptul studiului (Tabelul 25). Fiecare grup a fost eliminat din studiu atunci când volumul tumorii la orice animal din grup a fost > 2000 mm³. Ultimul grup a fost terminat în ziua 61.

Tabelul 25. Conceptul studiului

Grup	# Șoareci	Tratament	Doză (mg/kg)	Regim	Rută
1	5	PBS	0	bolus unic	i.v.
2	5	MORAb-003-VCP-eribulină	1		
3	5	MORAb-003-VCP-eribulină	2,5		
4	4 ¹	MORAb-003-VCP-eribulină	5		
5	5	MORAb003-0285	5		
¹ Patru șoareci în acest grup. Un șoarece a fost exclus din acest grup din cauza erorii cu injecție cu tratament, care a fost verificată prin absența compusului din serurile animale pe baza datelor de imunoanaliză prin electrochimiluminiscență (ECLIA). După un tratament cu doză unică, MORAb-003-0285 a cauzat TGI de 89,7% la 5 mg/kg (p < 0,0001 vs. soluție salină).					

Volumele tumorilor în șoarecii individuali sunt arătate în Tabelul 26, iar media grupului și SEM sunt arătate în Tabelul 27. Cinetica creșterii tumorii pentru fiecare grup (media grupului și eroarea standard a mediei, SEM) sunt arătate în Figura 11, iar volumele tumorilor în șoarecii individuali, precum și media grupului și SEM, sunt arătate în Figura 12. Pe baza volumelor tumorilor în ziua 17 (atunci când a fost observat primul volum al tumorii > 2000 mm³), MORAb-202 a cauzat inhibare a creșterii tumorale (TGI) de 47% la 1 mg/kg (p = 0,002 față de soluția salină), TGI de 96% la 2,5 mg/kg (p < 0,0001 față de soluția salină). Cu toate acestea, tumorile regresate au crescut din nou după una sau două săptămâni de la terminarea tratamentului. Nu a fost detectată nicio tumoră la șoarecii tratați cu 5 mg/kg de MORAb-202. Acești șoareci au rămas fără tumori mai mult de 60 de zile.

Greutatea corporală a șoarecilor individuali este arătată în Tabelul 28, iar media grupului și SEM sunt arătate în Tabelul 29. Cinetica schimbării greutății corporale pentru fiecare grup (media grupului și SEM) este arătată în Figura 13.

Nu a fost observată nicio pierdere semnificativă în greutate corporală în niciunul dintre grupurile de tratament în comparație cu controlul.

MORAb-202 a arătat un efect semnificativ asupra creșterii tumorii NCI-H2110. Regresia tumorii a fost obținută printr-un tratament în bolus la 2,5 mg/kg cu TGI de 94% (vs. PBS). Prin urmare, doza eficientă minimă de MORAb-202 este de 2,5 mg/kg, testată în acest model. Eradicarea completă a tumorii a fost obținută printr-o singură doză la 5 mg/kg. Nu s-a observat nicio creștere a tumorii timp de mai mult de 60 de zile.

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

108

Tabelul 26. Volumele tumorilor

zile după rando- mizare	PBS					MORAb-202 1 mg/kg					MORAb-202 2,5mg/kg					MORAb-202 5 mg/kg					003-0285 5 mg/kg				
0	164	195	137	300	80	178	218	133	118	150	187	189	92	120	236		110	202	159	146	65	208	241	243	97
3	368	413	279	587	171	178	207	104	106	216	144	97	65	69	148		40	115	68	68	83	259	358	292	164
5	327	481	285	555	190	161	193	83	95	215	75	51	37	35	56		14	52	22	37	54	160	168	239	105
6	467	758	541	894	275	257	258	139	160	348	61	52	58	33	57		7	28	25	20	43	197	235	247	129
7	642	815	621	1055	395	317	306	182	167	476	64	54	53	36	57		8	48	16	20	52	192	255	266	128
10	891	1238	895	1328	662	506	494	230	285	708	24	37	35	15	71		0	0	0	0	39	155	240	181	86
12	993	1274	983	1519	1115	638	655	371	361	865	40	21	51	9	69		0	0	0	0	32	106	206	223	83
14	981	1410	1131	1695	971	848	812	402	418	901	41	30	37	0	89		0	0	0	0	31	115	235	157	79
17	1320	1723	1319	2089	1466	955	980	727	592	946	46	33	64	0	161		0	0	0	0	28	114	346	251	74
19						838	1030	856	602	953	56	37	90	0	282		0	0	0	0	27	144	438	359	94
24											102	37	197	0	702		0	0	0	0	46	391	1244	824	187
26											168	102	319	0	790		0	0	0	0	103	564	1470	1030	287
28											269	54	474	9	990		0	0	0	0	125	703	1898	1112	375
31											362	105	558	13	1187		0	0	0	0	225	1144	2427	1413	657
33											496	124	588	9	1461		0	0	0	0					
35											573	212	669	16	1847		0	0	0	0					
38											764	348	952	20	2367		0	0	0	0					
40																	0	0	0	0					
42																	0	0	0	0					
45																	0	0	0	0					
47																	0	0	0	0					
52																	0	0	0	0					
54																	0	0	0	0					
59																	0	0	0	0					
61																	0	0	0	0					

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

109

Fiecare coloană reprezintă un animal individual.

Tabelul 27[illegible]

Tabelul 28

zile după rando- mizare	PBS					MORAb-202 1 mg/kg					MORAb-202 2,5mg/kg					MORAb-202 5 mg/kg			
0	19,1	18,2	18,4	18,9	18,8	19,1	18,6	19,3	20,6	18,4	17,8	18,1	18	19,8	16,3		17,6	18,7	16,1
3	19,6	18,2	18,9	18,9	19,3	19,3	18,4	20,2	20,9	18,6	18,4	19,1	18,6	19,9	16,4		17,5	18,8	15,9
6	19,7	18,4	18,4	19,1	19,1	19	18,3	20,3	21,3	19	18,5	19,4	18,7	20	16,4		17,5	19,3	16,3
7	19,7	18	18,9	18,8	18,9	18,9	18	20	21,2	18,9	18,7	18,7	18,7	19,7	16,5		17,4	19,4	16,5
10	19,7	18	19,2	18,5	19,1	18,4	18	20,1	20,9	19	19,3	19,7	18,8	19,8	16,6		17,6	19,4	16,7
12	19,8	17,7	19,1	18,4	19	18,3	17,8	20,5	20,9	19,5	18,9	20	19,7	20,2	17,2		17,9	19,6	16,9
14	18,8	17,4	18,4	18,2	17,5	17,9	17,7	20,3	21,2	19,9	18,8	19,6	19	19,3	17		17,5	19,3	17
17	18,8	17,2	18,3	17,5	17,2	17,4	17,7	20,4	20,7	19,2	18,8	19,8	19,7	19,2	17,3		17,9	20	17,3
19						16,7	17,2	19,9	20,7	18,9	18,3	19,8	18,7	19,5	16,8		18,1	20	17,1
24											18,8	20,2	19,2	19,9	16,9		18,5	20,7	17,5
26											18,9	19,6	18,9	19,5	16,5		18,3	20,7	17,6
28											18,8	19,6	19,5	19,6	16,6		18,6	21,3	17,6
31											18,9	20,1	19,6	20,7	17		18,6	20,4	17,9
33											18,9	19,8	19,4	21,2	17,6		18,8	19,6	18,2
35											19,2	19,7	19,5	20,7	17,4		18,7	20,2	18,1
38											19,6	20	19,7	20,6	18		18,8	20,4	19
40																	19,4	20,4	18,7
42																	19,9	20,4	18,8
45																	19,8	21	18,3
47																	19,7	20,7	18,3
52																	20,2	21,1	18,5
54																	20,3	21,4	18,6
59																	20	21,6	18,8
61																	20,5	22,1	19,2

Tabelul 29

zile după randomizare	PBS			MORAb-202 1 mg/kg			MORAb-202 2,5 mg/kg			MORAb-202 5 mg/kg	
	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM
0	18,68	0,165239	5	19,2	0,385328	5	18	0,554902	5	18,025	0,689078
3	18,98	0,234959	5	19,48	0,47393	5	18,48	0,579842	5	18,025	0,769253
6	18,94	0,245739	5	19,58	0,537015	5	18,6	0,609665	5	18,175	0,694839
7	18,86	0,268971	5	19,4	0,549488	5	18,46	0,525953	5	18,125	0,628577
10	18,9	0,29444	5	19,28	0,537015	5	18,84	0,585996	5	18,425	0,68618
12	18,8	0,352933	5	19,4	0,600608	5	19,2	0,545849	5	18,65	0,678513
14	18,06	0,267112	5	19,4	0,685817	5	18,74	0,454832	5	18,25	0,523801
17	17,8	0,320373	5	19,08	0,673649	5	18,96	0,451533	5	18,725	0,592675
19				18,68	0,764423	5	18,62	0,527655	5	18,85	0,670634
24							19	0,579498	5	19,225	0,663539
26							18,68	0,563279	5	19,075	0,621135
28							18,82	0,573795	5	19,4	0,728103
31							19,26	0,636533	5	19,45	0,638148
33							19,38	0,585826	5	19,475	0,60047
35							19,3	0,536644	5	19,15	0,416401
38							19,58	0,430983	5	18,85	0,584918
40										19,45	0,314619
42										19,925	0,359691
45										20,2	0,665164
47										19,96	0,549137
52										20,425	0,651414
54										20,725	0,758819
59										20,525	0,620064
61										20,775	0,552051

2.6.4 Evaluarea dozei eficiente minime de eribulină în modelul de hNSCLC NCI-H2110 în șoareci CB17-SCID

Celule de NSCLC uman, H2110, pasajul 46, au fost implantate subcutanat în 30 de șoareci CB17 SCID (de sex feminin, cu vârsta de 5 până la 6 săptămâni, cântărind 20 de grame). După 11 zile de la implantare, șoarecii au fost randomizați în cinci grupuri. Cele cinci animale cu volumele tumorale care se abat cel mai mult de la medie au fost excluse. Volumul mediu al tumorii în fiecare grup în ziua tratamentului (Ziua 0) a variat între 87,6 - 89,4 mm³ (Tabelul 32). Șoarecii înrolați au fost tratați cu eribulină (Lot # N1201193) la 0,05, 0,2, 0,8, sau 1,6 mg/kg, sau cu PBS, în conformitate cu conceptul studiului (Tabelul 30). Fiecare grup a fost terminat, respectiv, atunci când în cadrul grupului a fost observat pentru prima dată volumul tumorii > 2000 mm³. Studiul a fost încheiat în Ziua 38 (30 de zile după ultima doză).

Tabelul 30. Conceptul studiului

Grup	# Șoareci	Tratament	Doză (mg/kg)	Regim	Rută
1		PBS	0		
2	5		0,05		
3		Eribulină	0,2	q4dx3	i.v.
4	4*		0,8		
5	5		1,6		

Volumele tumorale la șoarecii individuali sunt arătate în Tabelul 31, iar media grupului și SEM sunt arătate în Tabelul 32. Cinetica creșterii tumorii pentru fiecare grup (media grupului și SEM) este arătată în Figura 14, iar volumele tumorale în șoarecii individuali, precum și media grupului și SEM în ziua 24 (atunci când la șoarecii tratați cu PBS au fost observate volume tumorale > 2000mm³), sunt arătate în Figura 15. Eribulina a cauzat TGI de 50,5% (fără regresie tumorală observată) la 0,05 mg/kg ($p = 0,0026$ vs. soluție salină); TGI de ~99% la 0,2, 0,8, sau 1,6 mg/kg (valorile p au fost < 0,0001 pentru toate cele 3 grupuri atunci când se compară cu soluția salină). Doza eficientă minimă care a indus regresia tumorii este de 0,2 mg/kg. Cu toate acestea, majoritatea tumorilor regresate în acești șoareci (3/5 în grupul 0,2 mg/kg, 4/5 în grupul 0,8 mg/kg, și 2/5 în grupul 1,6 mg/kg) au crescut din nou sau au rămas măsurabile pe toată durata studiului (30 de zile după ultima doză).

Greutatea corporală a șoarecilor individuali este arătată în Tabelul 33, iar media grupului și SEM sunt arătate în Tabelul 34. Cinetica schimbării greutatei corporale pentru fiecare grup (media grupului și SEM) sunt arătate în Figura 16.

Nu au fost observate pierderi semnificative de greutate corporală în niciunul dintre grupurile de tratament în comparație cu grupul de control tratat cu soluție salină. Nu au fost observate constatări clinice care să indice toxicitate în timpul tratamentului.

Eribulina, la 0,2 mg/kg și mai mult, administrată q4dX3 i.v., a arătat un efect semnificativ asupra creșterii tumorii H2110, a fost obținută regresia tumorală. Atunci când a fost administrată o doză mai mică (la 0,05 mg/kg), nu a fost obținută nicio regresie tumorală. Prin urmare, doza eficientă minimă testată în acest studiu este de 0,2 mg/kg.

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

113

Tabelul 31

zile după prima doză	vehicul					eribulină 0,05 mg/kg					eribulină 0,2mg/kg					eribulină 0,8 mg/kg					eribulină 1,6 mg/kg				
0	59	91	118	88	91	105	101	94	61	77	103	68	78	130	62	111	104	81	93	54	70	116	74	91	91
3	62	179	219	236	173	175	149	117	161	64	68	62	52	79	61	54	55	40	51	33	50	44	44	44	47
5	80	255	436	283	257	231	157	228	261	132	60	60	48	90	51	32	29	34	42	25	25	22	32	24	24
7	111	433	440	472	446	357	171	269	247	102	48	47	39	49	47	26	34	17	21	24	19	12	31	15	11
10	230	555	747	622	489	370	200	413	376	226	33	39	28	36	47	17	22	19	5	21	15	0	29	14	0
12	263	677	722	877	620	539	265	448	350	135	19	41	23	13	14	15	23	16	12	24	13	0	14	0	0
17	720	959	960	1158	885	725	514	751	620	531	0	0	0	0	13	17	38	0	0	26	0	0	0	0	0
19	862	1314	940	1097	941	869	437	908	776	837	27	39	29	29	16	0	20	18	0	27	0	0	19	0	0
24	1886	2308	1854	2760	1671	712	718	1489	1225	1040	0	15	19	23	11	14	0	20	0	33	18	0	19	0	0
26											0	24	0	11	14	0	8	14	14	15	8	0	17	0	0
28											0	7	0	14	83	0	16	20	14	17	0	0	16	0	0
31											0	16	0	10	31	0	10	15	26	29	11	0	17	0	0
33											0	27	0	13	22	0	13	8	18	44	8	0	28	0	0
35											0	19	0	16	42	0	13	0	22	50	14	0	17	0	0
38											0	19	0	14	45	0	11	13	13	54	11	0	20	0	0

Tabelul 32

	PBS			eribulină 0,05mg/kg			eribulină 0,2mg/kg			eribulină 0,8mg/kg	
zile după prima doză	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM
0	89,4	9,34	5	87,6	8,18	5	88,2	12,56	5	88,6	10,02
3	173,8	30,31	5	133,2	19,74	5	64,4	4,45	5	46,6	4,31
5	262,2	56,43	5	201,8	24,37	5	61,8	7,43	5	32,4	2,83
7	380,4	67,55	5	229,2	43,40	5	46	1,79	5	24,4	2,83
10	528,6	85,83	5	317	43,21	5	36,6	3,17	5	16,8	3,07
12	631,8	101,42	5	347,4	70,14	5	22	5,07	5	18	2,34
17	936,4	70,46	5	628,2	48,40	5	2,6	2,60	5	16,2	7,39
19	1030,8	80,29	5	765,4	84,75	5	28	3,65	5	13	5,50
24	2095,8	195,76	5	1036,8	149,24	5	13,6	3,94	5	13,4	6,26
26							9,8	4,54	5	10,2	2,83
28							20,8	15,74	5	13,4	3,48
31							11,4	5,77	5	16	5,29
33							12,4	5,53	5	16,6	7,45
35							15,4	7,72	5	17	9,22
38							15,6	8,25	5	18,2	9,25

Tabelul 33

zile după prima doză	vehicul					eribulină 0,05 mg/kg					eribulină 0,2mg/kg					eribulină 0,8 mg/kg				
0	18,5	16,7	19,1	20,4	19,6	19,1	16,4	18,6	20,1	17,9	18,2	18,5	16,7	19,8	18,9	18,6	17,8	18,4	17,8	
3	18,8	16,6	19,6	20,9	20,0	19,4	17,1	18,5	20,4	18,7	18,6	18,5	16,9	19,6	19,8	18,8	18,0	18,4	18,1	
5	18,8	16,8	19,3	21,2	20,0	19,4	16,5	18,4	20,4	19,4	18,5	19,1	16,9	20,2	20,1	18,9	18,1	18,5	17,6	
7	18,6	16,5	19,3	21,2	19,8	19,4	16,3	18,7	20,3	19,1	18,5	18,5	17,1	19,6	20,7	19,1	18,1	19,0	17,8	
8	18,3	16,7	18,8	21,1	19,6	19,3	16,3	18,4	20,4	19,4	18,6	19,1	17,0	19,6	19,9	19,2	18,0	19,0	17,7	
9	18,4	16,4	18,5	21,0	19,5	18,8	16,1	18,6	19,9	19,1	18,3	20,0	16,8	19,5	19,5	19,2	17,7	18,5	17,5	
10	19,0	17,2	19,2	21,6	20,3	19,7	16,3	19,4	20,5	20,0	18,7	19,4	17,1	20,0	20,1	19,0	17,7	18,9	17,8	

zile după prima doză	vehicul					eribulină 0,05 mg/kg					eribulină 0,2mg/kg					eribulină 0,8 mg/kg				
12	19,0	15,9	18,5	21,3	19,2	18,8	15,9	18,6	19,6	19,7	18,3	19,3	16,9	19,7	19,9	18,9	17,8	19,0	17,8	
17	18,8	15,5	17,8	20,4	18,3	17,5	16,0	18,5	18,0	19,7	19,0	19,3	17,4	20,5	20,0	19,2	18,0	18,8	18,1	
19	18,9	15,6	17,2	20,6	18,1	17,8	16,3	18,4	18,0	19,4	19,1	19,0	17,1	21,1	21,0	19,1	17,7	19,4	18,7	
24	18,2	15,8	17,4	20,3	18,2	18,8	16,5	18,8	17,4	18,0	19,3	20,2	18,8	21,7	22,0	20,1	18,5	20,3	19,1	
26											19,8	20,9	18,6	22,0	20,4	20,3	18,1	19,9	19,3	
28											20,1	20,6	18,1	21,5	21,0	20,3	17,8	20,2	19,6	
31											18,7	20,1	18,7	22,0	21,2	20,1	18,2	20,3	19,5	
33											20,0	20,3	18,4	22,2	21,8	20,2	18,3	21,0	19,2	
35											19,5	20,1	18,7	22,1	21,4	20,1	17,8	21,0	19,3	
38											19,8	20,8	18,3	21,6	21,6	20,4	18,1	21,4	19,4	

Fiecare coloană reprezintă un animal individual.

Tabelul 34

	PBS			eribulină 0,05 mg/kg			eribulină 0,2 mg/kg			eribulină 0,8 mg/kg	
zile după prima doză	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM
0	18,9	0,62	5	18,4	0,62	5	18,4	0,51	5	18,1	0,16
3	19,2	0,73	5	18,8	0,54	5	18,7	0,51	5	18,5	0,19
5	19,2	0,73	5	18,8	0,66	5	19,0	0,60	5	18,3	0,22
7	19,1	0,77	5	18,8	0,67	5	18,9	0,60	5	18,6	0,27
10	18,9	0,72	5	18,8	0,69	5	18,8	0,51	5	18,5	0,29
12	18,8	0,76	5	18,5	0,65	5	18,8	0,59	5	18,3	0,30
17	19,5	0,73	5	19,2	0,74	5	19,1	0,55	5	18,5	0,32
19	18,8	0,86	5	18,5	0,68	5	18,8	0,56	5	18,5	0,28
24	18,2	0,79	5	17,9	0,60	5	19,3	0,53	5	18,6	0,24
26							19,5	0,74	5	18,8	0,30
28							20,4	0,63	5	19,7	0,36
31							20,3	0,56	5	19,7	0,48

	PBS			eribulină 0,05 mg/kg			eribulină 0,2 mg/kg			eribulină 0,8 mg/kg	
zile după prima doză	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM
33							20,3	0,59	5	19,7	0,50
35							20,1	0,66	5	19,8	0,43
38							20,5	0,68	5	19,8	0,47

EXEMPLUL 2**1. Materiale și metode**

MORAb003-VCP-eribulină (MORAb-202) a fost sintetizat prin conjugarea MORAb-003 (anti-receptorul alfa al folatului uman umanizat) la compusul MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001159569) descris în secțiunea 1.1 din Exemplul 3. Metoda de conjugare este descrisă în secțiunea 1.4.1 din Exemplul 4.

1.1 Modele tumorale

Liniile de celule tumorale umane utilizate în evaluarea suplimentară *in vitro* a MORAb-202 includ IGROV1 (carcinom ovarian uman, $FR^{hi(++)}$), OVCAR3 (carcinom ovarian uman, $FR^{med(++)}$), NCI-H2110 (carcinom pulmonar cu celule non-mici umane, $FR^{med(++)}$), A431-A3 (linia celulară parentală A431 transfectată stabil cu mezotelină umană, $FR^{lo(+/-)}$), SJSA-1 (osteosarcom uman, $FR^{neg(-)}$), și HL-60 (leucemie umană, $FR^{neg(-)}$). Toate aceste linii celulare au fost obținute direct de la American Type Culture Collection (ATCC). Pentru studiile *in vivo* au fost stabilite modele de șoareci cu xenogrefă derivată de la pacienți cu cancer pulmonar cu celule non-mici, cancer de sân triplu negativ, și cancer endometrial, și au fost menținute la Oncotest GmbH (Freiburg, Germania), Oncodesign (Dijon, Franța), și EPO Berlin-Buch GmbH (Berlin, Germania), respectiv.

1.2 Analize de citotoxicitate *in vitro***1.2.1 Analiza cu violet de gențiană**

Celule IGROV1 ($FR^{hi(++)}$), A431-A3 ($FR^{lo(+/-)}$), și SJSA-1 ($FR^{neg(-)}$) au fost sub-cultivate și însemănțate la 10.000 de celule/godeu în mediu de creștere complet în plăci de cultură de țesut cu 96 de godeuri, incubate la 37°C, CO₂ 5% pe parcursul nopții (16 ore). De obicei, reactivii de test au fost diluați în serie 1:4 în plăci de diluție cu godeuri adânci de 2 mL, începând de la 1 μM (10 diluții în total). La plăcile de celule s-au adăugat 100 μL de probe diluate (concentrația inițială a probelor de test la 100 nM). Plăcile au fost incubate la 37°C, CO₂ 5% o perioadă suplimentară de 48 de ore. Mediul a fost aruncat, plăcile au fost spălate o dată cu 200 μL de DPBS, colorate cu 50 μL de soluție de violet de gențiană 0,2% la temperatura camerei timp de 15 min, și apoi spălate intens cu apă de la robinet. Plăcile au fost uscate la aer, și violet de gențiană a fost dizolvat cu 200 μL de soluție SDS 1%. Plăcile au fost citite la 570 nm. Datele au fost analizate folosind GraphPad Prism 6. Pentru OVCAR3 ($FR^{med(++)}$) și NCI-H2110 ($FR^{med(++)}$), celulele au fost însemănțate la 3.000 de celule/godeu și incubate timp de 5 zile cu MORAb-202.

1.3 Studii *in vivo***1.3.1 Modelul de xenogrefă NCI-H2110**

Pregătirea animalelor: Șoareci CB17 SCID (de sex feminin, în vârstă de 6 săptămâni) au fost adăpostiți într-un număr de 5 șoareci per cușcă ventilată. Pentru animale au fost disponibile, ad lib, peleți de alimente sterilizați și sticle de apă. Animalele au fost acclimatizate timp de 5 - 7 zile înainte de implantarea tumorii.

Cultura de celule: Celule NCI-H2110 umane au fost decongelate din stoc congelat (NB2813-65) și cultivate în mediu RPMI-1640 suplimentat cu ser fetal bovin 10% (FBS) în CO₂ 5% la 37°C. După două pasaje, la atingerea confluentei la aproximativ 70%, celulele au fost recoltate folosind soluție de disociere a celulelor, spălate de două ori cu mediu fără ser, și numărate.

Implantarea tumorii: Suspensia de celule în mediu fără ser a fost amestecată cu matrigel rece ca gheața la 1:1 (v:v) la o concentrație finală de $1,0 \times 10^8$ celule/mL. Fiecare șoarece a fost injectat subcutanat cu 100 μL de amestec la $1,0 \times 10^7$ celule/șoarece. Pentru toate injecțiile a fost folosit un ac de 27G. Șoarecii au fost monitorizați pentru bunăstarea clinică și tumorile au fost măsurate cu șubler digital de trei ori pe săptămână, începând din Ziua 3 după implantare. Volumul tumorii (mm³) a fost calculat utilizând formula: $W \text{ (mm)} \times L \text{ (mm)} \times D \text{ (mm)} \times \pi/6$. Atunci când tumorile au atins ~100 mm³ (cu o medie de > 70 până la ~130 mm³), animalele au fost randomizate la 4 - 5 per grup. Au fost excluse cele 5 animale cu volumele tumorale care se abat cel mai mult de la medie.

Conceptul studiului: Șoarecii experimentali înrolați au fost injectați intravenos cu 200 μL de vehicul sau MORAb-202 la 1,0, 2,5, și 5 mg/kg, în conformitate cu conceptul studiului (Tabelul 35), în ziua randomizării. Greutatea corporală a fost măsurată înainte de doză, și de două ori pe săptămână pe parcursul studiului. La sfârșitul studiului, greutatea corporală terminală a fost măsurată și înregistrată. Animalele au fost eutanasiate atunci când volumul individual al tumorii a depășit 2000 mm³. Criteriile de terminare timpurie înainte de atingerea volumului tumoral maxim permis au inclus: (1) ulceratii tumorale mai mari de 50% din tumoră (v:v); (2) paralizie; (3) pierdere în greutate corporală > 20%; și (4) 50% dintre animalele din cadrul grupului au îndeplinit terminarea. Orice șoarece eutanasiat sau găsit mort pe parcursul studiului a fost procesat urmând procedura terminală descrisă mai sus.

Tabelul 35. Conceptul studiului

Grup	# Șoareci	Tratament	Doză (mg/kg)	Regim	Rută
1	5	Vehicul	0	bolus unic	i.v.
2		MORAb-202	1		
3			2,5		
4			5		

1.3.2 Modele de xenogrefe derivate de la pacient (PDx)

1.3.2.1 Modelul de PDx de cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC): LXFA-737 (Oncotest)

Implantarea tumorii: Fragmente tumorale de NSCLC au fost obținute de la xenogrefele tumorale LXFA-737 cu pasaje în serie în șoareci nud. După îndepărtarea de la șoareci donori, tumorile au fost tăiate în fragmente (lungimea marginii de 3 - 4 mm) și plasate în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) conținând 10% penicilină/streptomicină. Animalele primitoare au fost anesteziate prin inhalare de izofluran și au primit implanturi tumorale unilaterale sau bilaterale subcutanat în flanc. Xenogrefele tumorale au fost implantate cu una sau două tumori per șoarece cu o rată de achiziție < 65%. În cazul unei achiziții bilaterale, una dintre aceste tumori a fost explantată înainte de randomizare. Animalele și implanturile tumorale au fost monitorizate zilnic până când creșterea tumorii solide a fost detectabilă la un număr suficient de animale. La randomizare a fost determinat volumul tumorilor în creștere. Animale care îndeplinesc criteriile de randomizare (adică purtătoare de tumori de 50 - 250 mm³, preferabil 80 - 200 mm³) au fost distribuite în grupuri experimentale formate din 5 - 6 animale per grup, având ca scop volume tumorale de grup mediane și medii comparabile, de aproximativ 100 - 120 mm³. Animalele care nu au fost utilizate pentru experimente au fost eutanasiate. Ziua randomizării a fost desemnată ca Ziua 0 a experimentului.

Conceptul studiului: Șoarecii experimentali înrolați au fost injectați intravenos cu vehicul, MORAb-003 la 5 mg/kg, sau MORAb-202 la 5 mg/kg, în conformitate cu conceptul studiului (Tabelul 36), în ziua randomizării. Greutatea corporală a fost măsurată înainte de doză în fiecare zi de dozare, și de două ori pe săptămână pe parcursul studiului. La sfârșitul studiului, greutatea corporală terminală a fost măsurată și înregistrată. Animalele au fost eutanasiate atunci când volumul individual al tumorii a depășit 2000 mm³.

Tabelul 36. Conceptul studiului

Grup	# Șoareci	Tratament	Doză (mg/kg)	Regim	Rută
1	6	Vehicul	0	bolus unic	i.v.
2	6	MORAb-003	5		
3	6	MORAb-202	5		

1.3.2.2 Modelul de PDx de cancer de san triplu negativ (TNBC): OD-BRE-0631 (Oncodesign)

Implantarea tumorii: Nouă șoareci SWISS nud de sex feminin au fost injectați subcutanat în flancul drept cu fragmente tumorale de TNBC derivate de la pacient. Șoarecii purtători de tumori au fost eutanasiați atunci când volumul tumorii a atins 500 - 1000 mm³, iar tumorile au fost excizate chirurgical. Fragmente tumorale (30 - 50 mg) au fost implantate ortotopic în regiunea pernei de grăsime mamară a 34 de șoareci SWISS nud de sex feminin după 24 până la 72 de ore de la o iradiere a întregului corp cu o sursă gamma (2 Gy, 60Co, BioMEP, Franța). Atunci când tumorile au atins un volum mediu de 200 - 300 mm³, 24 dintre cele 34 de animale totale au fost randomizate în două grupuri (n = 12 animale) în conformitate cu volumul individual al tumorii lor utilizând software-ul Vivo Manager® (Biosystemes, Couteron, Franța). Pentru a evalua omogenitatea între grupuri a fost efectuat un test statistic (analiza varianței). Ziua randomizării a fost desemnată ca Ziua 0 a experimentului.

Conceptul studiului: În Ziua 1 (o zi după randomizare și două zile înainte de tratament), 3 șoareci din fiecare dintre cele două grupuri netratate au fost terminați. Șoarecii experimentali rămași au fost injectați intravenos cu vehicul sau MORAb-202 la 5 mg/kg, în conformitate cu conceptul studiului (Tabelul 37), în Ziua 3. În Ziua 8 (cinci zile după tratament), 3 șoareci din fiecare dintre cele două grupuri de tratate au fost terminați. Imediat după terminare, țesutul tumoral a fost colectat și fixat în 4% formalină tamponată neutră timp de 24 până la 48 de ore, și apoi încorporat în parafină (Histosec®, Merck, Darmstadt, Germania). Proba încorporată în parafină a fost depozitată la temperatura camerei pentru analiza imunohistochimică ulterioară.

Tabelul 37. Conceptul studiului

Grup	# Șoareci	Tratament	Doză (mg/kg)	Regim	Rută
1	3	n/a	n/a	n/a	n/a
	9	Vehicul	0	bolus unic	i.v.
2	3	n/a	n/a	n/a	n/a
	9	MORAb-202	5	bolus unic	i.v.

Analiza imunohistochimică (IHC): Colorarea IHC a țesuturilor tumorale încorporate în parafină, fixate în formalină, a fost efectuată pentru a evalua atât ocuparea MORAb-202, cât și exprimarea fibroblastelor asociate cancerului. Înainte de colorare, lamelele au fost deparafinate și antigenul a fost recuperat într-un Lab Vision™ PT Module (Thermo Scientific), în tampon citrat (pH 6,0) pre-încălzit la 85°C, utilizând următorul program: încălzire la 97°C; incubare la 97°C timp de 30 min; și răcire la 60°C. Lamelele au fost apoi transferate în apă dublu distilată la temperatura camerei timp de 5 min. Colorarea a fost efectuată într-un Lab Vision™ Autostainer 360 (Thermo Scientific). Pe scurt, lamelele au fost spălate de două ori în soluție salină tamponată cu Tris 1X/Tween-20 (TBST) timp de 6 min/spălare. Secțiunile de țesut au fost apoi incubate în tampon de blocare (300 µL) (ser de capră 10% (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc., nr. cat. 005-000-121) diluat în 3% albumină serică bovină (BSA) - soluție salină tamponată cu fosfat (PBS)) timp de 1 oră, incubate în anticorp conjugat (200 µL) (Tabelul 38) timp de 1 oră, și spălat de cinci ori în TBST 1X timp de 6 min/spălare. Lamelele au fost colorate cu o culoare contrastantă cu DAPI în medii de montare, iar lamelele acoperite cu lamele au fost lăsate să se întărească timp de 30 de min. Lamelele au fost procesate pe un scanner Panoramic MIDI (3DHISTECH), iar imaginile IHC au fost analizate folosind software-ul Halo (Indica Labs). Anticorpii utilizați în această analiză au ținut α-actina mușchiului neted (SMA), care este un marker specific pentru fibroblastele asociate cancerului, și IgG umană, care poate detecta prezența MORAb-202.

Tabelul 38. Anticorpi IHC

Anticorp	Conjugat	Vânzător	Nr. cat.	Lot	Soluție stoc	Soluție de lucru
α-actina mușchiului neted (SMA)-FITC	FITC	Sigma	F3777	124M4775V	2,0 mg/mL	5,0 µg/mL
IgG1 de șoarece, controlul izotipului κ	AF488	Biolegend	400129	B 128493	0,2 mg/mL	1:1000
anti-IgG umană de capră	AF555	Mol. Probes	A21433	1709318	n/a	1:200

1.3.2.3 Modele de PDX de cancer endometrial: Endo-12961 și Endo-10590 (EPO Berlin)

Implantarea tumorii: Fragmente de tumoră de cancer endometrial au fost obținute din xenogrefe tumorale Endo-12961 și Endo-10590 cu pasaje în serie, și depozitate ca stoc în azot fluid. Fragmentele tumorale au fost implantate subcutanat în flancul stâng al 40 de șoareci de sex feminin NMRI nu/nu, și a fost monitorizat volumul tumorii. Șoareci cu un volum al tumorii de 100 - 160 mm³ au fost randomizați în unul dintre cele patru grupuri (Grupurile A - D, Tabelul 39). Șoarecii satelit pentru randomizare au fost incluși într-un al cincilea grup (Grupul E, Tabelul 39). Fiecare grup a fost alcătuit din 8 animale. Ziua randomizării a fost desemnată ca Ziua 0 a experimentului.

Conceptul studiului: Șoarecii experimentali înrolați au fost injectați intravenos cu PBS, eribulină la 3,2 mg/kg sau 0,1 mg/kg, sau MORAb-202 la 5 mg/kg, în conformitate cu conceptul studiului (Tabelul 39), în ziua randomizării. Creșterea tumorii a fost evaluată prin măsurarea a două diametre perpendiculare de două ori pe săptămână, și au fost calculate valorile volumului tumorii (TV), volumului relativ al tumorii (RTV) și tratat/control (T/C). Greutatea corporală a fost evaluată, de asemenea, de două ori pe săptămână ca un parametru pentru toxicitate, cu calcularea greutății corporale per grup și a modificărilor greutății corporale (BWC) față de începutul tratamentului. Animalele au fost sacrificate atunci când volumul tumorii individuale a depășit 1 cm³, sau la sfârșitul studiului.

Tabelul 39. Conceptul studiului

Grup	# Șoareci	Tratament	Doză (mg/kg)	Regim	Rută
A	8	PBS	0	bolus unic	i.v.

Grup	# Șoareci	Tratament	Doză (mg/kg)	Regim	Rută
B		Eribulină	3,2		
C		Eribulină	0,1		
D		MORAb-202	5		
E		n/a	n/a	n/a	n/a

1.4 Mecanism de acțiune

1.4.1 Sistem de co-cultură tridimensional (3D) în zPredicta

Toate experimentele de co-cultură 3D care conțin celule stem mezenchimale (MSC) au fost efectuate în zPredicta, utilizând sisteme de matrice extracelulară 3D specifică organului, cum ar fi rStomach™. Celulele stem mezenchimale ale măduvei osoase (BM-MSC-uri) în rStomach™ au fost co-cultivate cu linia de celule de cancer gastric Nuc Red Light MKN-74 în cvadruplicat în format de 48 de godeuri timp de 12 zile. S-a demonstrat anterior că celulele MKN-74 exprimă suficient receptorul alfa al folatului (FR) pentru tratamentul MORAb-202 pentru a induce apoptoza celulară. Înainte de cultură, BM-MSC-urile au fost evaluate pentru exprimarea antigenului țintă și pentru markerii diferențierii MSC (Tabelul 40) prin citometrie în flux.

Tabelul 40. Markerii diferențierii MSC

Populația de celule	Markeri
Celule stem mezenchimale (MSC-uri)	Stro-1 ⁺ /CD105 ⁺
Pre-adipocite	CD34 ⁺ /CD31 ⁻
Adipocite	Oil red
Fibroblaste asociate cancerului (CAF-uri)	alfa-actina mușchiului neted (α SMA), vimentină
Pre-pericite/pericite	NG2 ⁺ , CD13 ⁺ , CD146 ⁺
Toate	FRA

Culturile rStomach™ au fost tratate fie cu MORAb-202, anticorp MORAb-003 neconjugat, eribulină, fie cu control, așa cum este descris în Tabelul 41. Controalele au inclus culturi netratate și tratate cu vehiculul (PBS și DMSO). Diferențierea MSC a fost monitorizată prin microscopie cu lumină. Odată ce s-a observat diferențierea vizibilă, probele au fost recoltate pentru colorare și analiză de citometrie în flux.

Tabelul 41. Tratamente de co-cultură

Agent	Concentrație (concentrații) de lucru
MORAb-202	10 nM
MORAb-003 (anticorp neconjugat)	10 nM
Eribulină	1,7 nM și 0,2 nM
PBS	
DMSO	0,1%
Control netratat	

1.4.2 Analiza cursului în timp a efectului MORAb-202 asupra fibroblastelor asociate cancerului

Șoareci purtători de tumori de xenogrefă H2110 subcutanată au fost preparați așa cum este descris în secțiunea 1.3.1. Probele tumorale au fost recoltate în Zilele 0, 3, 5, 7, și 9 după administrarea vehiculului sau a MORAb-202 la 5 mg/kg. Probele tumorale colectate au fost prelucrate pe lamele, iar exprimarea fibroblastelor asociate cancerului a fost analizată prin IHC așa cum este descris în secțiunea 1.3.2.2.

2. Rezultate

2.1 Analize de citotoxicitate *in vitro*

2.1.1 Citotoxicitatea MORAb-202

Potența *in vitro* a MORAb-202 a fost evaluată folosind o analiză cu violet de gențiană, așa cum este detaliat în secțiunea 1.2.1. Screening-ul a fost efectuat pe celule IGROV1 (FR^{hi(+++)}), OVCAR3 (FR^{med(++)}), NCI-H2110 (FR^{med(++)}), A431-A3 (FR^{lo(+/-)}), și SJSA-1 (FR^{neg(-)}). Rezultatele acestui screening sunt furnizate în Figura 17 și Tabelul 42.

Tabelul 42. Screening-ul de citotoxicitate (CE₅₀) al MORAb-202 pe diferite linii de celule tumorale

EC ₅₀ (nM)				
IGROV I	OVCAR3	NCI-H2110	A431-A3	SJSA-1
(FR+++)	(FR++)	(FR++)	(FR+/-)	(FR-)
0,01	0,16	0,74	23	> 100

MORAb-202 a prezentat citotoxicitate dependentă de exprimarea receptorului alfa al folatului împotriva liniilor celulare tumorale, și niveluri scăzute de ucidere departe de țintă. MORAb-202 a demonstrat cel mai înalt nivel de potență (0,01 nM) pe celule IGROV1, cu citotoxicitate redusă (> 100 nM) pe celulele SJSA-1 negative la receptorul alfa al folatului. Potența intermediară a fost observată în celulele OVCAR3 și NCI-H2110 (0,16 nM și 0,74 nM).

2.2 Studii *in vivo*

2.2.1 Eficacitatea MORAb-202 în modelul de xenogrefă NC1-H2110

Șoareci purtători de tumori H2110 subcutanate au fost injectați intravenos cu vehicul sau MORAb-202 la 1, 2,5, și 5 mg/kg. Regresia semnificativă a tumorii a fost observată după o doză unică de MORAb-202 la 5 mg/kg (Figura 18 și Tabelul 43). Folosind acest model de xenogrefă cu exprimare ridicată a receptorului alfa al folatului și administrări de doză unică, fereastra terapeutică pentru MORAb-202 s-a dovedit a fi 1 mg/kg pentru întârzierea creșterii tumorii (cu boală stabilă) și ≥ 2,5 mg/kg pentru regresia tumorii. În acest studiu, MORAb-202 la o doză de 2,5 mg/kg a avut ca rezultat un răspuns parțial, iar MORAb-202 la o doză de 5 mg/kg a avut ca rezultat un răspuns complet.

Tabelul 43. Activitatea antitumorală a MORAb-202 în modelul de xenogrefă NC1-H2110

	Volumul tumorii, mm ³ (Inhibarea creșterii tumorii, %)	
	Ziua 17	Ziua 31
Vehicul (n = 5)	1583,4 ± 146,1 (100)	n/a
MORAb-202, 1 mg/kg, doză unică (n = 5)	840,0 ± 76,8 (53,1)	n/a
MORAb-202, 2,5 mg/kg, doză unică (n = 5)	60,8 ± 27,1 (3,8)	1173,2 ± 373,2
MORAb-202, 5 mg/kg, doză unică (n = 4)	0,0 (0,0)	0 (0,0)

2.2.2 Eficacitatea MORAb-202 în modelul de PDx de NSCLC: LXFA-737

Șoareci purtători de tumori de PDx de NSCLC subcutanate au fost injectați intravenos cu vehicul, MORAb-003 la 5 mg/kg, sau MORAb-202 la 5 mg/kg. O singură doză de MORAb-202 (5 mg/kg) a avut ca rezultat regresia semnificativă a tumorii în acest model, spre deosebire de o singură doză de anticorp MORAb-003 neconjugat (5 mg/kg), care nu a demonstrat activitate anti-tumorală semnificativă (Figura 19A). Cinci dintre cei șase șoareci în total tratați cu MORAb-202 au fost considerați fără tumori în Ziua 32 a studiului (Tabelul 44), și patru au rămas fără tumori până în Ziua 74 (terminarea studiului). În plus, nu a fost observată nicio pierdere de greutate corporală semnificativă în grupul de tratament în comparație cu grupul de control tratat cu vehicul, indicând nicio toxicitate pe parcursul tratamentului (Figura 19B).

Tabelul 44. Activitatea antitumorală a MORAb-202 în modelul de PDx de NSxLC

	Volumul tumorii, mm ³ (Inhibarea creșterii tumorii, %)		
	Ziua 21	Ziua 32	Ziua 74
Vehicul (n = 6)	1004,5 (100)	1561,3 (100)	n/a
MORAb-003, 5 mg/kg, doză unică (n = 6)	860,7 (85,7)	1572,1 (100,7)	n/a

	Volumul tumorii, mm ³ (Inhibarea creșterii tumorii, %)		
	Ziua 21	Ziua 32	Ziua 74
MORAb-202, 5 mg/kg, doză unică (n = 6)	22,9(2,3)	4,7 (0,3)	418,3 (4/6 fără tumori)

2.2.3 Eficacitatea relativă a MORAb-202 și eribulinei în modelele de PDx de cancer endometrial: Endo-12961 și Endo-10590

Xenogrefele de Endo-12961 și Endo-10590 exprimă niveluri ridicate ale receptorului alfa al folatului. Șoareci purtători de tumori de PDx de cancer endometrial subcutanate au fost injectați intravenos cu PBS, eribulină la 3,2 mg/kg sau 0,1 mg/kg, sau MORAb-202 la 5 mg/kg. Doza maximă tolerată (MTD) de eribulină în acest model este de 3,2 mg/kg, în timp ce 0,1 mg/kg este echivalent cu doza de eribulină furnizată de MORAb-202 administrat la 5 mg/kg. În tot începutul studiului s-a observat activitate antitumorală semnificativă în urma tratamentului cu MORAb-202 (5 mg/kg) și doza MTD de eribulină (3,2 mg/kg) în ambele modele animale, în timp ce nu a fost observată nicio activitate anti-tumorală semnificativă în urma tratamentului cu eribulină la 0,1 mg/kg (Figurile 20A și 20C). Cu toate acestea, tumorile regresate la șoareci tratați cu eribulină la 3,2 mg/kg au început să crească din nou pe parcursul duratei studiului, în timp ce nu s-a remarcat nicio re-creștere semnificativă a tumorii la șoarecii tratați cu MORAb-202. În acest studiu s-a constatat că MORAb-202 este semnificativ mai eficient decât eribulina. Tratamentul cu eribulină a afectat, de asemenea, temporar greutatea corporală în prima săptămână post-tratament (Figurile 20B și 20D). În schimb, la animalele tratate cu MORAb-202 nu a fost observată nicio pierdere de greutate corporală.

2.3 Mecanismul de acțiune al MORAb-202

2.3.1 IHC și eficacitatea MORAb-202 în modelul de PDx de TNBC: OD-BRE-0631

Șoareci purtători de tumori de PDx de TNBC subcutanate au fost injectați intravenos cu vehicul sau MORAb-202 la 5 mg/kg. Țesutul tumoral a fost colectat de la șoareci din fiecare grup înainte de tratament (Ziua 1) și după tratament (Ziua 8). Analizele IHC ale țesuturilor tumorale colectate au arătat că MORAb-202 ocupă celule tumorale care exprimă receptorul alfa al folatului după cinci zile de la tratament (Ziua 8), în urma administrării în Ziua 3 ca doză unică (5 mg/kg). Ocuparea celulei a fost evaluată folosind un anticorp anti-IgG umană (Figura 21A). De asemenea, s-a arătat că tratamentul cu MORAb-202 diminuează structura fibroblastelor asociate cancerului, așa cum se arată prin colorarea IHC cu un anticorp anti- α -actină a mușchiului neted (SMA)-FITC (Figura 21B). În ceea ce privește eficacitatea, tratamentul cu MORAb-202 a avut ca rezultat regresia tumorală maximă la 11 zile după tratament, măsurată printr-un volum tumoral relativ (RTV) de 0,62 (Figura 21C).

2.3.2 Efectul MORAb-202, MORAb-003, și eribulinei asupra sistemului de co-cultură 3D

Celulele stem mezenchimale ale măduvei osoase (BM-MSCs) în rStomach™ (zPredicta) au fost cultivate cu linia de celule de cancer gastric MKN-74 timp de 12 zile. Înainte de cultură, BM-MSC-urile au fost evaluate pentru exprimarea receptorului alfa al folatului și pentru markerii diferențierii MSC prin citometrie în flux. Culturile rStomach™ au fost apoi tratate fie cu MORAb-202, anticorp MORAb-003 neconjugat, eribulină, fie cu control. Odată ce diferențierea MSC vizibilă a fost observată prin microscopie cu lumină, probele au fost recoltate pentru colorare și analiză de citometrie în flux. Rezultatele acestor analize sunt arătate în Figura 22.

O durată totală a tratamentului de 7 zile, cu completarea tratamentului pe parcursul acestei perioade, a fost suficientă pentru a produce un efect măsurabil asupra diferențierii BM-MSC-urilor umane în cultură cu celule MKN-74. În raport cu controlul cu vehicul, tratamentul cu MORAb-202 (10 nM) a avut ca rezultat o creștere a MSC și populațiilor de adipocite, și o scădere a populațiilor de pericite (Tabelul 45). Aceste date indică faptul că MORAb-202 poate avea un efect semnificativ asupra micromediului tumoral.

Tabelul 45. Efectul MORAb-202, MORAb-003 și eribulinei asupra sistemului de co-cultură 3D

Tratament	Procentul de celule vii		
	MSC-uri	Adipocite	Pericite
PBS	32,3%	0,72%	14,6%
MORAb-202	43,7%	22,6%	11,4%

	Procentul de celule vii		
Tratament	MSC-uri	Adipocite	Pericite
MORAb-003	37,1%	0,69%	24,0%
Eribulină	29,9%	2,68%	25,8%

2.3.3 Analiza cursului in timp a efectului MORAb-202 asupra fibroblastelor asociate cancerului

Probe tumorale au fost recoltate de la șoareci purtători de tumoră din xenogrefă H2110 subcutanată în Zilele 0, 3, 5, 7 și 9 după administrarea vehiculului, sau a MORAb-202 la 5 mg/kg. Probele tumorale colectate au fost prelucrate pe lamele, iar exprimarea fibroblastelor asociate cancerului (CAF) a fost analizată prin IHC. Structura de rețea CAF, așa cum a fost evaluată și cuantificată prin colorare cu un anticorp anti- α -actină musculară netedă (SMA)-FITC, a fost proeminentă în Ziua 3 și Ziua 5, după administrarea unei doze unice de MORAb-202 la 5 mg/kg (Figura 23). Cu toate acestea, până în Ziua 7, majoritatea acestei structuri a fost diminuată în mod semnificativ.

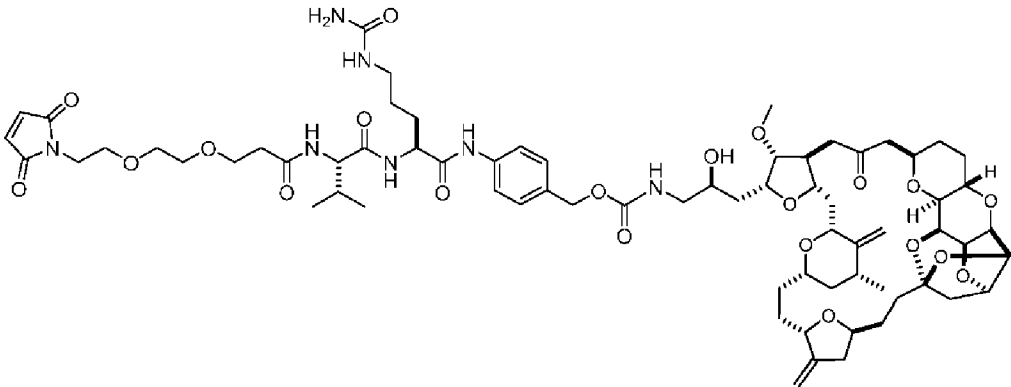
EXEMPLUL 3

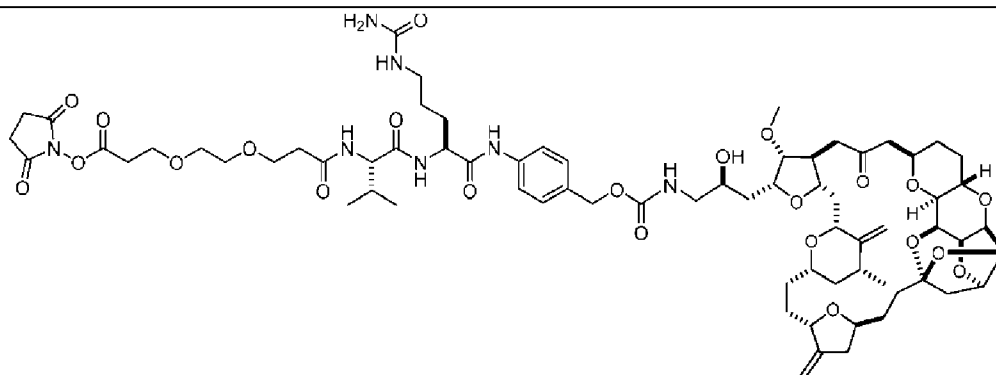
1. Materiale și metode

Compuși de eribulină care pot fi conjugați, având structurile arătate în Tabelul 46, au fost sintetizați în conformitate cu următoarele proceduri, și au fost utilizați în prepararea ADC-urilor (Exemplul 4).

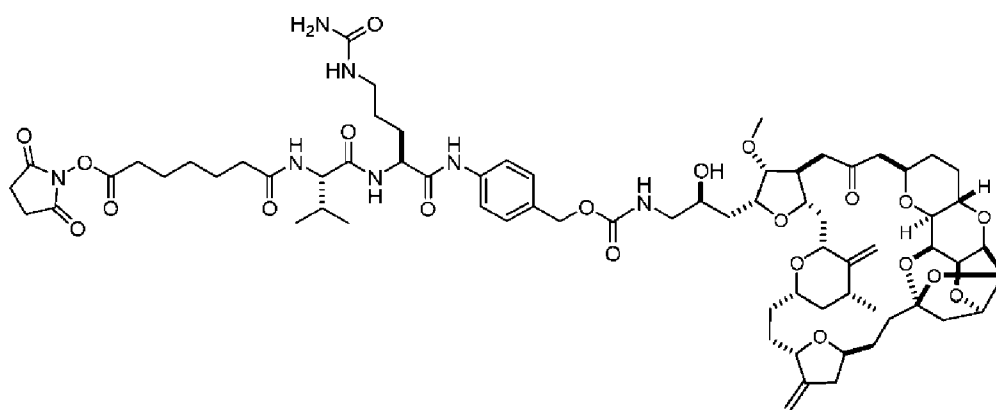
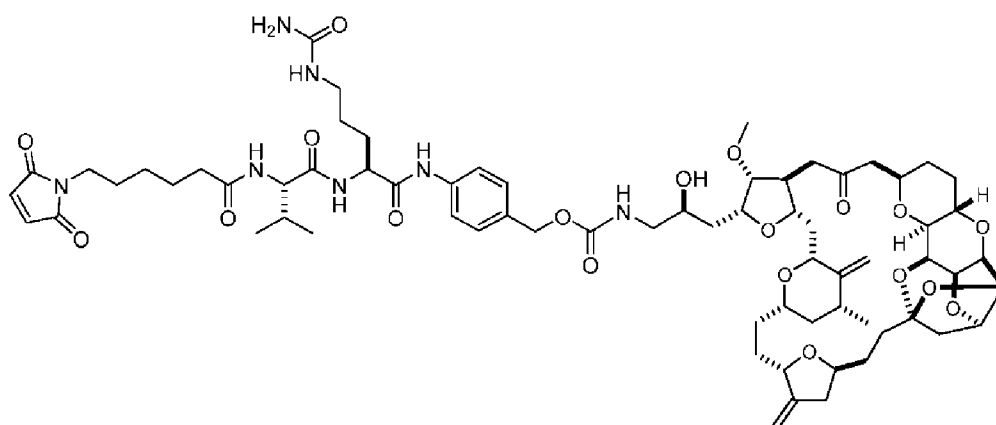
Toți solvenții utilizați în reacțiile de sinteză au fost de grad anhidru (EMD Millipore). Toți solvenții utilizați pentru prelucrare sau purificare au fost de grad de cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) (EMD Millipore). Cu excepția cazului în care este indicat în alt fel, toate substanțele chimice au fost disponibile în comerț. Cromatografia pe coloană a fost efectuată folosind un Biotage® SP4. Eliminarea solventului a fost efectuată utilizând fie un evaporator rotativ (Buchi Labortechnik AG), fie un evaporator centrifugal (Genevac, SP scientific). Cromatografia lichidă preparativă-spectrometria de masă (LC/MS) a fost efectuată utilizând Waters AutoPurification System și o coloană C18 XTerra MS (5 μ m, 19 mm x 100 mm) în condiții de fază mobilă acidă. Spectrele de rezonanță magnetică nucleară (RMN) au fost prelevate folosind cloroform deuterat (CDCl₃) cu excepția cazului în care este declarat în alt fel, și au fost înregistrate la 400 sau 500 MHz folosind un instrument Varian (Agilent Technologies). Spectrele de masă au fost prelevate folosind un Waters Acquity Ultra Performance LC/MS. Așa cum este utilizat în acest document, termenul "inert" se referă la înlocuirea aerului dintr-un reactor (de exemplu, un vas de reacție, un balon, un reactor din sticlă) cu un gaz inert, în esență lipsit de umiditate, cum ar fi azotul sau argonul. Multiplicitățile sunt indicate folosind următoarele abrevieri: s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = cvartet, quint = cvintet, sxt = sextet, m = multiplet, dd = dublet de dublete, ddd = dublet de dublete de dublete, dt = dublet de triplete, br s = un singlet larg.

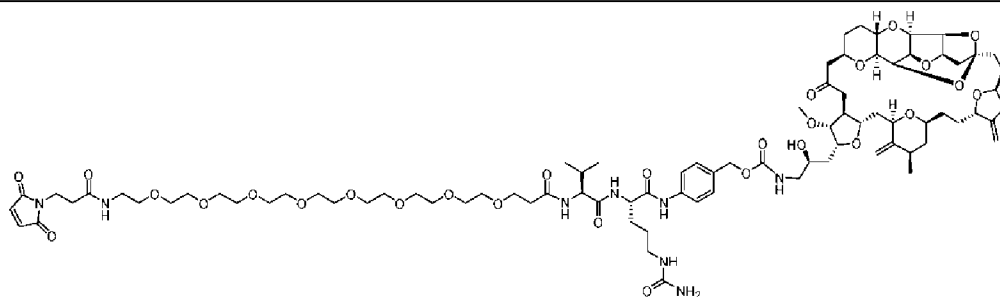
Tabelul 46. Compuși de eribulină care pot fi conjugați


MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001159569)

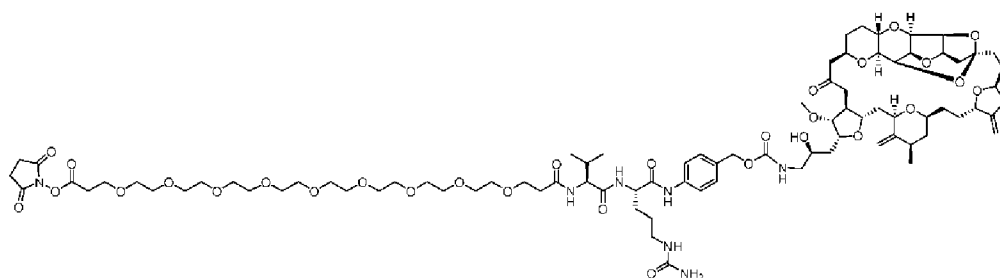


NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001236940)

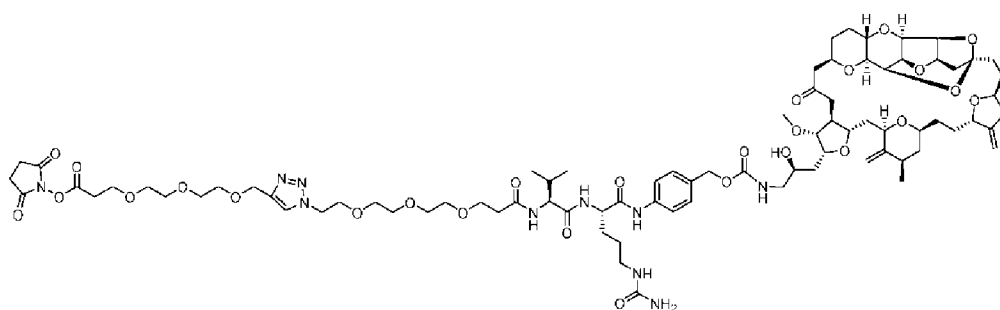
NHS-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001236941)Mal-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001235638)



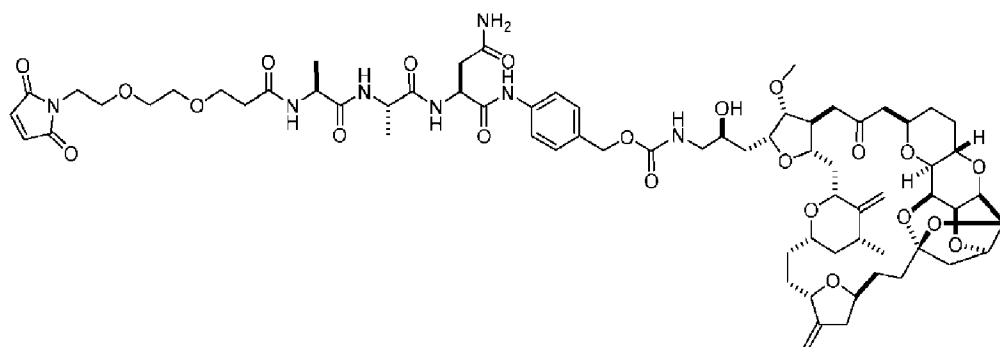
Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001242287)



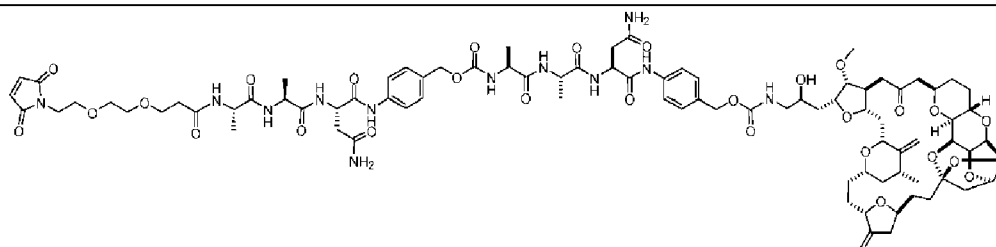
NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001242288)



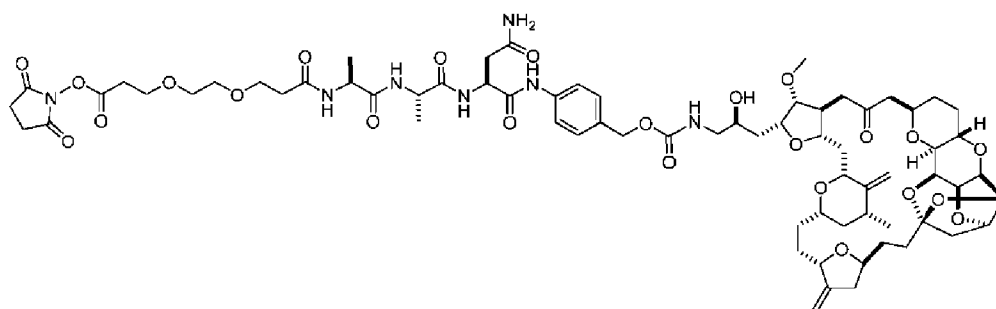
NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001243700)



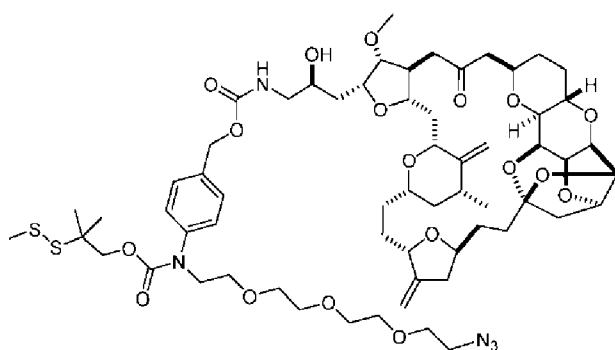
Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulină (ER-001231679)



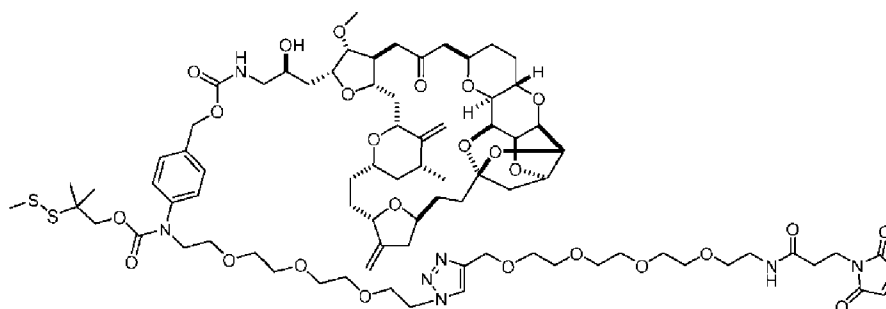
Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulină (ER-001231690)



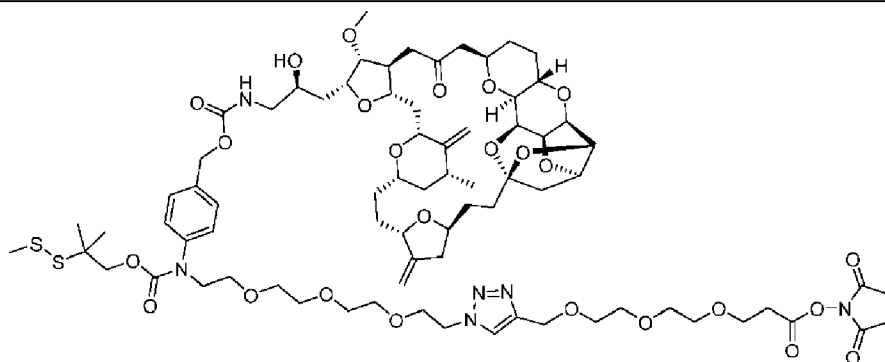
NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulină (ER-001231691)



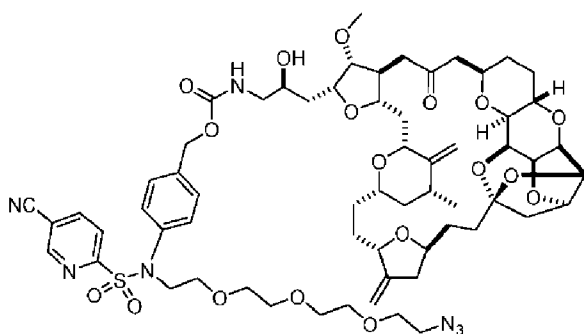
Azidă-PEG3-disulfidă-PAB-eribulină (ER-001237508)



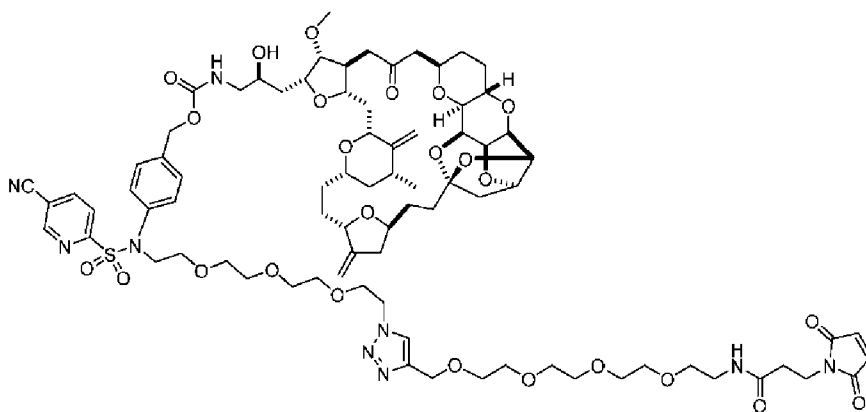
Mal-PEG4-triazol-PEG3-disulfidă-PAB-eribulină (ER-001237504)



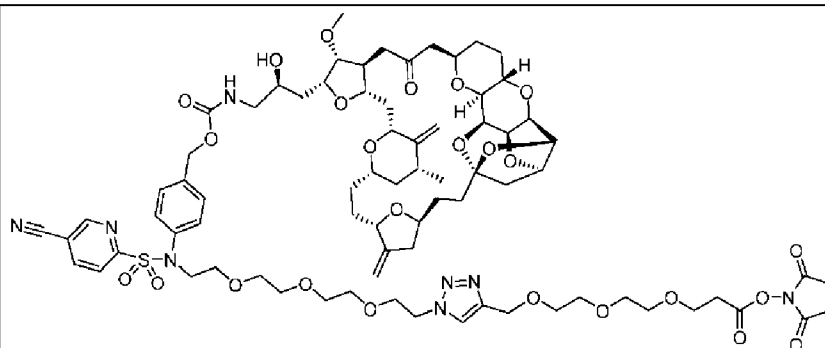
NHS-PEG3-triazol-PEG3-disulfidă-PAB-eribulină (ER-001244129)



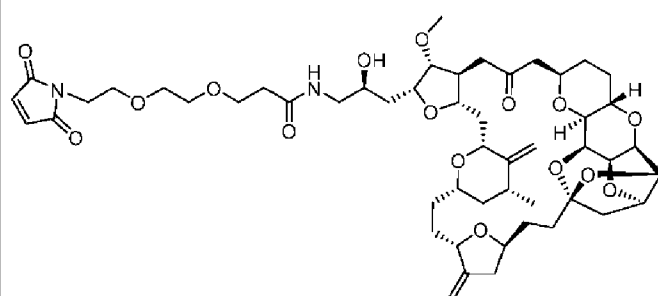
Azidă-PEG3-sulfonamidă-PAB-eribulină (ER-001138856)



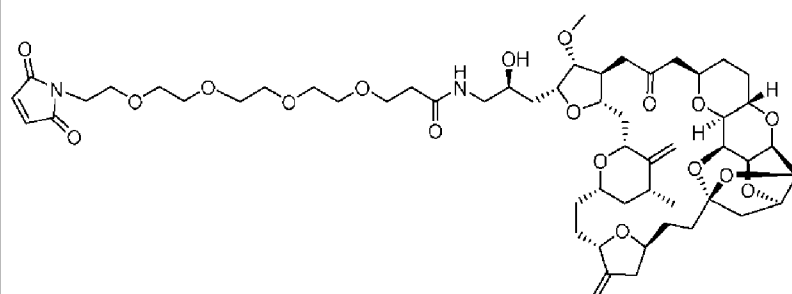
Mal-PEG4-triazol-PEG3-sulfonamidă-PAB-eribulină (ER-001237505)



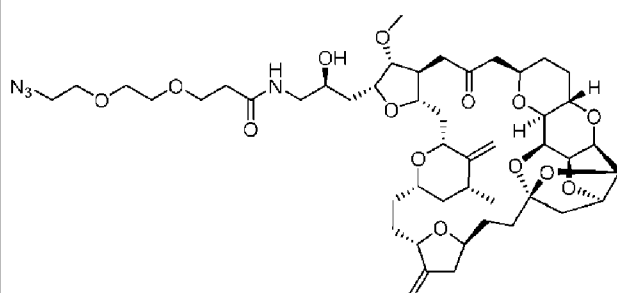
NHS-PEG3-triazol-PEG3-sulfonamidă-PAB-eribulină (ER-001244623)



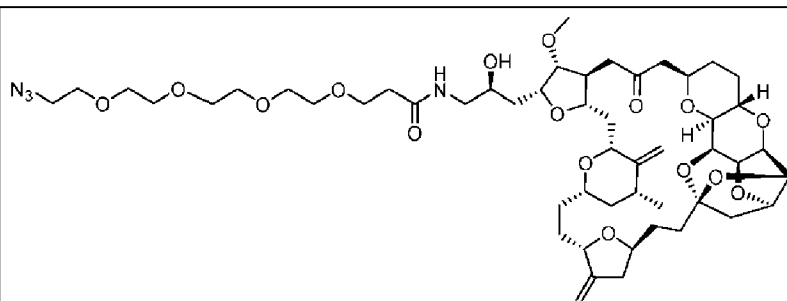
Mal-PEG2-eribulină



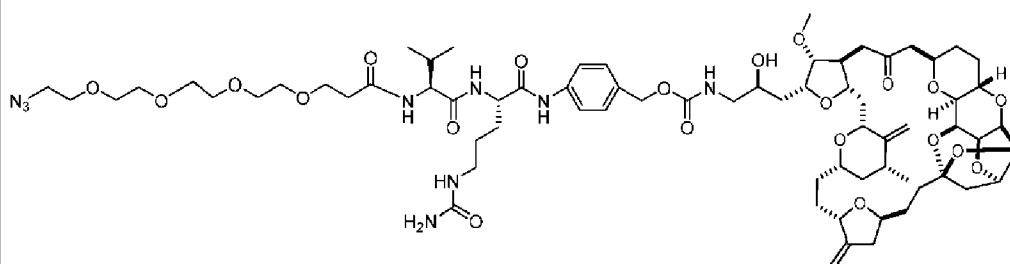
Mal-PEG4-eribulină



Azido-PEG2-eribulină

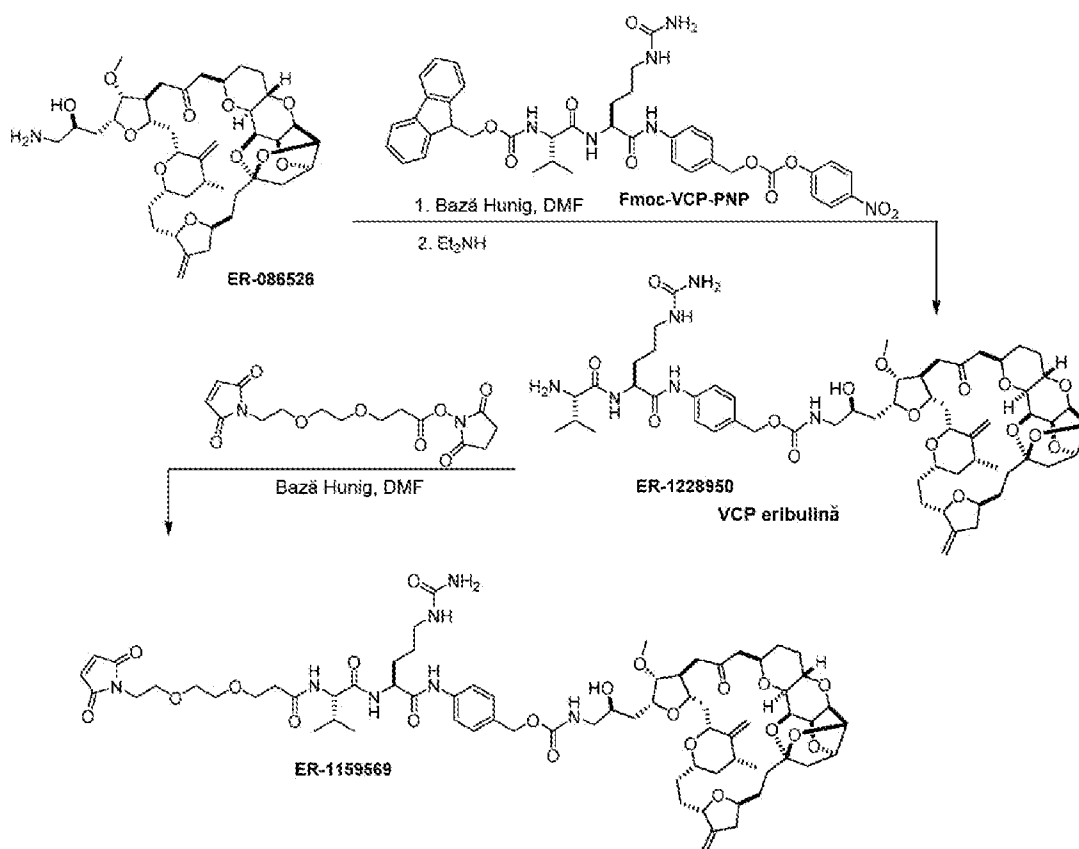


Azido-PEG4-eribulină



Azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulină

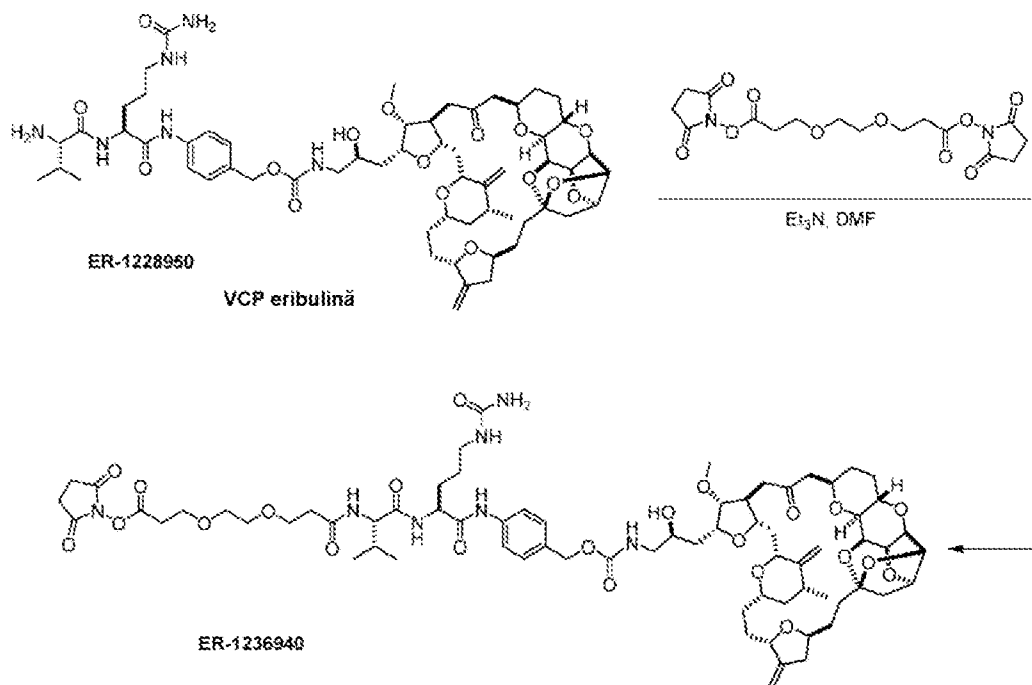
1.1 Preparare de MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001159569)



In *N,N*-dimetilformamidă (DMF) (6,0 mL) s-a dizolvat eribulină (ER-000086526) (61,5 mg, 0,074 mmol) și apoi s-a amestecat cu bază Hunig (0,027 mL, 0,156 mmol) și Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (86 mg, 0,112 mmol). Reacția a fost agitată la temperatura camerei timp de 18 ore până când cuplarea a fost completă, așa cum a fost determinat prin analiza cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC). La amestec a fost adăugată dietilamină (0,078 mL, 0,745 mmol), și amestecul a fost agitat o perioadă suplimentară de 2 ore până când reacția a fost completă. Solventul a fost îndepărtat prin evaporare, și reziduu a fost purificat prin cromatografie rapidă pentru a obține Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001228950) sub forma unui solid de culoare albă (60 mg, randament 71%). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,56 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,32 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 5,06 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 5,03 (s, 1H), 5,01 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,62 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,57 (dd, $J = 4,8, 8,8$ Hz, 1H), 4,47 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 4,32 - 4,27 (m, 2H), 4,18 (dd, $J = 4,8, 6,4$ Hz, 1H), 4,13 - 4,07 (m, 2H), 3,98 (t, $J = 10,4$ Hz, 1H), 3,88 - 3,82 (m, 3H), 3,76 - 3,70 (m, 4H), 3,60 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H), 3,38 (s, 3H), 3,26 - 3,10 (m, 3H), 2,93 (dd, $J = 2,0, 11,2$ Hz, 1H), 2,91 - 2,84 (m, 1H), 2,75 - 2,64 (m, 2H), 2,44 - 2,29 (m, 5H), 2,21 - 1,97 (m, 8H), 1,93 - 1,83 (m, 3H), 1,79 - 1,72 (m, 5H), 1,68 - 1,29 (m, 8H), 1,11 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,07 - 1,01 (m, 1H), 1,06 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,02 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), LCMS ($M+H$) = 1135,7.

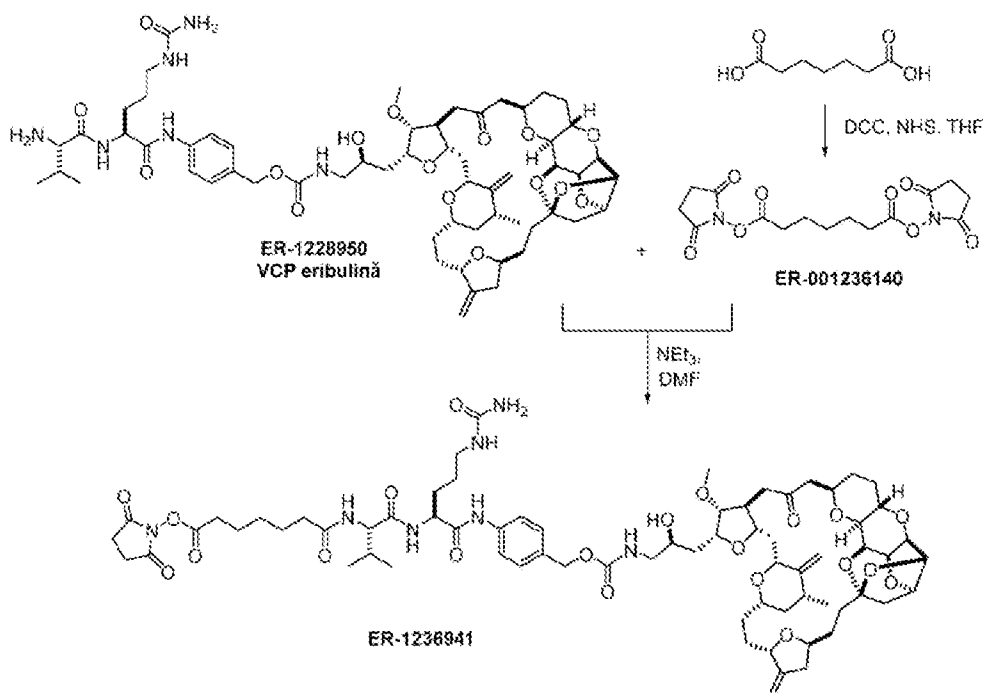
In DMF (1 mL) s-a dizolvat Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001228950) (16 mg, 14 μmol). La această soluție au fost apoi adăugate *N,N*-diizopropiletilamină (7,2 μL , 41 μmol) și Mal-PEG2-NHS (9,7 mg, 27 μmol) la temperatura camerei, și amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 1 oră. La finalizarea reacției, amestecul brut a fost purificat prin HPLC cu fază inversă utilizând o fază mobilă acetonitril-apă conținând acid formic 0,1%. Frațiile colectate au fost concentrate sub vid la temperatura camerei într-o baie de apă neîncălzită pentru a rezulta Mal-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001159569) (7,1 mg, 5,2 μmol , randament 38%). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,59 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,31 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,81 (s, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,06 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,01 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,71 (t, $J = 4,0$ Hz, 1H), 4,61 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,50 (dd, $J = 5,2, 9,2$ Hz, 1H), 4,47 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 4,32 - 4,27 (m, 2H), 4,19 (dd, $J = 6,8, 11,6$ Hz, 1H), 4,13 - 4,07 (m, 2H), 3,98 (t, $J = 10,4$ Hz, 1H), 3,88 - 3,82 (m, 3H), 3,76 - 3,64 (m, 6H), 3,62 - 3,51 (m, 6H), 3,38 (s, 3H), 3,22 - 3,08 (m, 4H), 2,93 (dd, $J = 2,4, 9,6$ Hz, 1H), 2,92 - 2,84 (m, 1H), 2,76 - 2,63 (m, 2H), 2,52 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,44 - 2,29 (m, 5H), 2,21 - 1,97 (m, 8H), 1,93 - 1,83 (m, 3H), 1,80 - 1,66 (m, 5H), 1,66 - 1,28 (m, 10H), 1,11 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H), 1,07 - 1,01 (m, 1H), 0,99 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,97 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H), LCMS ($M+H$) = 1374,9.

1.2 Preparare de NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001236940)



Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001228950) (45 mg, 0,04 mmol) și 3,3'-(etan-1,2-diilbis(oxi))dipropanoat de bis(2,5-dioxopirolidin-1-il) (79 mg, 0,198 mmol) au fost amestecate în DMF (1,5 mL), și apoi s-a adăugat Et₃N (44,2 μl, 0,317 mmol). Amestecul a fost agitat timp de 18 ore până când reacția a fost completă, așa cum a fost determinat prin analiza HPLC. Solventul a fost evaporat și reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă pentru a obține NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001236940) sub forma unui solid de culoare albă (38 mg, randament 68%). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7,58 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,33 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 5,05 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,03 (s, 1H), 5,01 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,62 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,51 (dd, *J* = 4,8, 8,8 Hz, 1H), 4,50 - 4,47 (m, 1H), 4,32 - 4,27 (m, 2H), 4,21 (dd, *J* = 4,8, 6,4 Hz, 1H), 4,14 - 4,08 (m, 2H), 3,99 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,88 - 3,82 (m, 3H), 3,78 - 3,70 (m, 4H), 3,62 (s, 2H), 3,62 - 3,58 (m, 1H), 3,50 - 3,46 (m, 2H), 3,39 (s, 4H), 3,36 (s, 3H), 3,22 - 3,08 (m, 3H), 2,93 (dd, *J* = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,91 - 2,87 (m, 1H), 2,84 (s, 2H), 2,80 (s, 2H), 2,75 - 2,64 (m, 2H), 2,59 - 2,52 (m, 2H), 2,44 - 2,29 (m, 5H), 2,21 - 1,97 (m, 10H), 1,93 - 1,83 (m, 3H), 1,79 - 1,72 (m, 5H), 1,68 - 1,29 (m, 8H), 1,11 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,08 - 0,98 (m, 1H), 1,00 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,98 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), LCMS (M+H) = 1421,0.

1.3 Preparare de NHS-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001236941)

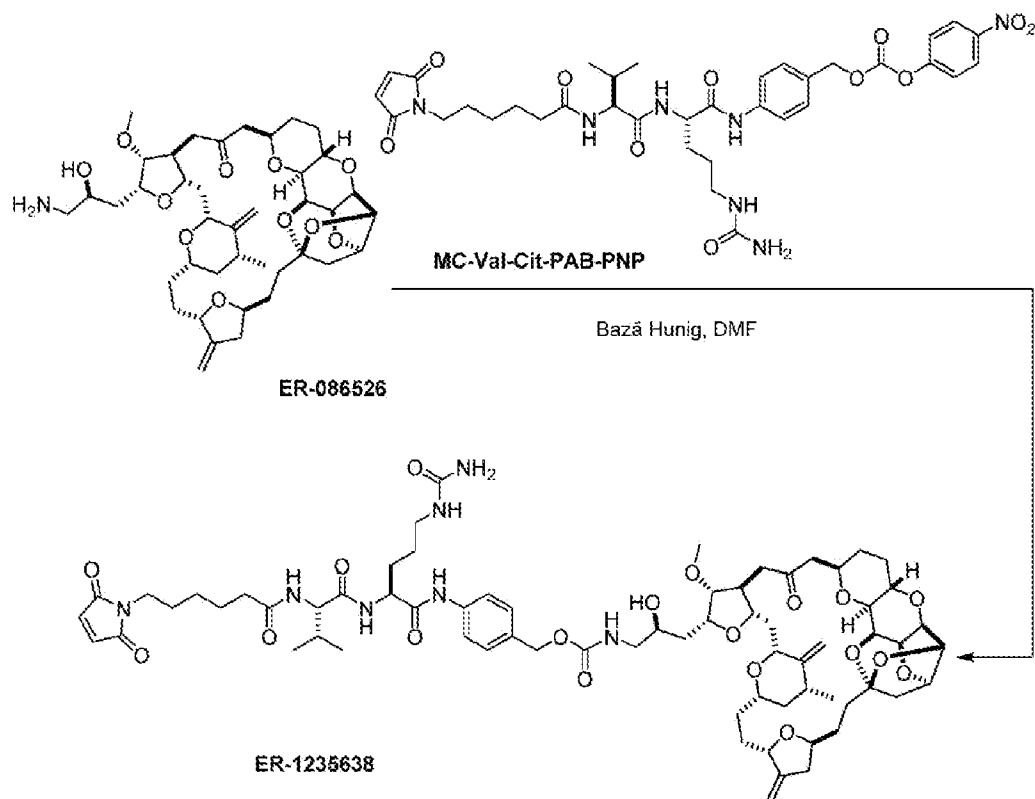


În tetrahidrofuran (THF) (100 mL) a fost dizolvat acid heptandioic (1,6 g, 9,99 mmol), și s-a adăugat apoi 1-hidroxipirolidin-2,5-dionă (2,299 g, 19,98 mmol), după care a urmat adăugarea de DCC (4,12 g, 19,98 mmol). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 18 ore până când analiza HPLC a indicat finalizarea reacției. Solidul a fost îndepărtat prin filtrare printr-un strat de celite, și a fost spălat cu THF (3 x 2 mL). Filtratul combinat a fost concentrat și purificat prin cromatografie rapidă pentru a rezulta bis(2,5-dioxopirolidin-1-il) heptandioat (ER-001236140) sub forma unui solid de culoare albă (2,5 g, randament 71%). ¹H RMN (400 MHz) δ ppm 2,83 (s, 8H), 2,64 (t, *J* = 7,6 Hz, 4H), 1,80 (dt, *J* = 7,6 Hz, 4H), 1,59 - 1,51 (m, 2H), LCMS (M+H) = 355,2.

NHS-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001236941) a fost preparat (8,5 mg, randament 47%) din VCP-eribulină (ER-001228950) și bis(2,5-dioxopirolidin-1-il) heptandioat (ER-001236140) utilizând aceeași procedură ca aceea descrisă mai sus pentru prepararea de NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001236940). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7,56 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,30 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,04 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 5,01 (s, 1H), 5,00 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,86 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,70 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,60 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,50 (dd, *J* = 4,8, 8,8 Hz, 1H), 4,46 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 4,36 - 4,25 (m, 2H), 4,17 (dd, *J* = 4,8, 6,4 Hz, 1H), 4,13 - 4,06 (m, 2H), 3,97 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,87 - 3,80 (m, 3H), 3,74 -

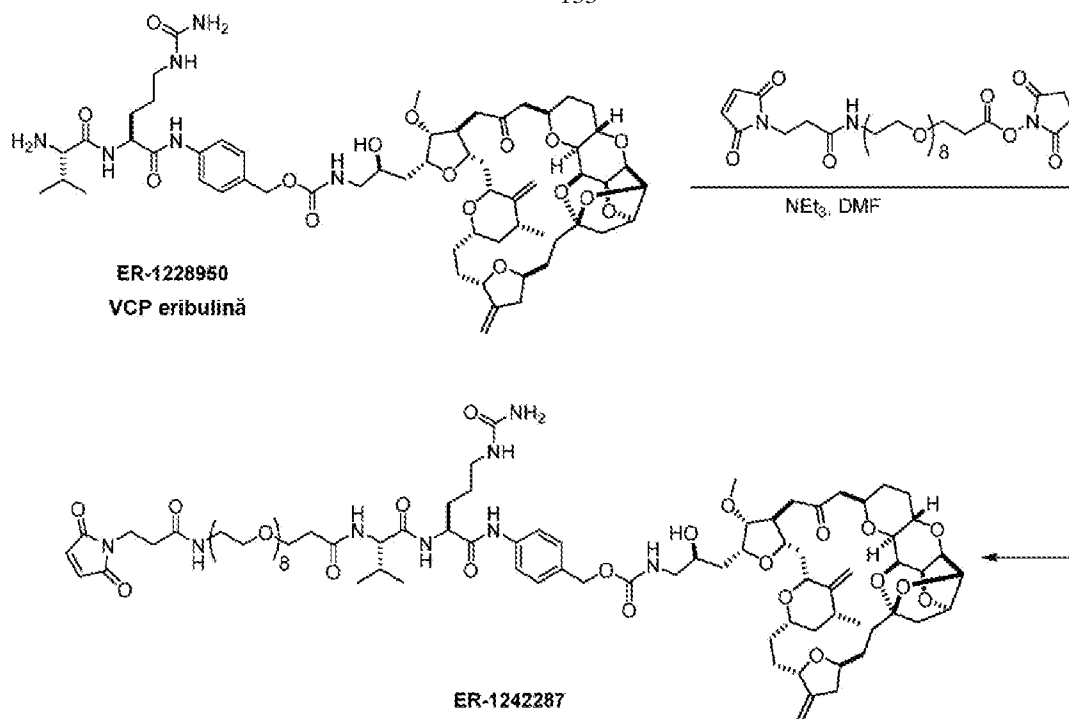
3,68 (m, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,20 - 3,06 (m, 4H), 2,94 (dd, $J = 2,0, 11,2$ Hz, 1H), 2,90 - 2,82 (m, 1H), 2,82 (s, 4H), 2,74 - 2,65 (m, 2H), 2,61 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H), 2,46 - 2,26 (m, 7H), 2,24 - 1,81 (m, 13H), 1,78 - 1,28 (m, 19H), 1,10 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,06 - 0,96 (m, 1H), 0,97 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,95 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), LCMS (M+H) = 1375,1.

1.4 Preparare de Mal-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001235638)



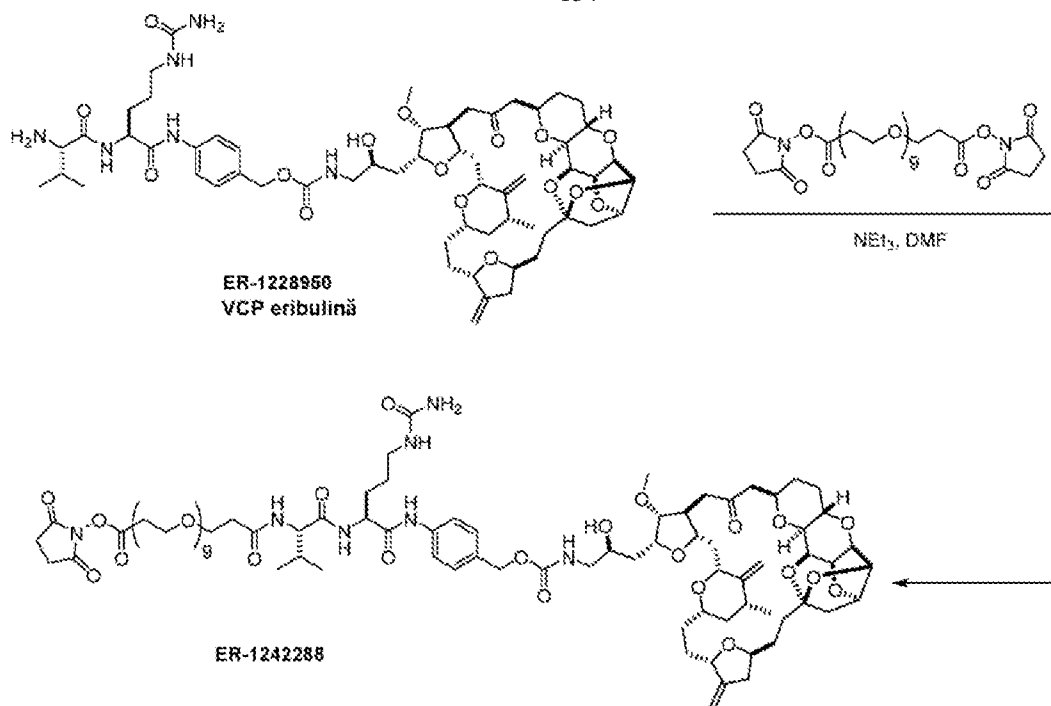
În DMF (1 mL) a fost dizolvată eribulină (ER-000086526) (10 mg, 0,012 mmol), și s-a amestecat cu MC-Val-Cit-PAB-PNP (9,02 mg, 0,012 mmol) și bază Hunig (4,44 μ L, 0,025 mmol). Amestecul a fost apoi agitat la temperatura camerei timp de 12 ore până când analiza HPLC a indicat finalizarea reacției. Amestecul de reacție a fost concentrat și purificat prin cromatografie rapidă pentru a rezulta Mal-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001235638) sub forma unui solid de culoare albă (11,3 mg, randament 63%). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7,57 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,31 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,79 (s, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,05 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,00 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,61 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,56 - 4,46 (m, 3H), 4,35 - 4,27 (m, 2H), 4,20 - 4,07 (m, 4H), 3,98 (t, $J = 10,8$ Hz, 1H), 3,87 - 3,83 (m, 3H), 3,73 - 3,70 (m, 2H), 3,48 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,20 - 3,08 (m, 4H), 2,93 (dd, $J = 1,6, 9,6$ Hz, 1H), 2,89 - 2,85 (m, 1H), 2,69 (dt, $J = 11,2, 16,8$ Hz, 2H), 2,44 - 2,33 (m, 5H), 2,27 - 1,83 (m, 13H), 1,78 - 1,68 (m, 5H), 1,66 - 1,27 (m, 14H), 1,11 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,07 - 0,98 (m, 1H), 0,98 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,96 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), LCMS (M+H) = 1328,9.

1.5 Preparare de Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001242287)



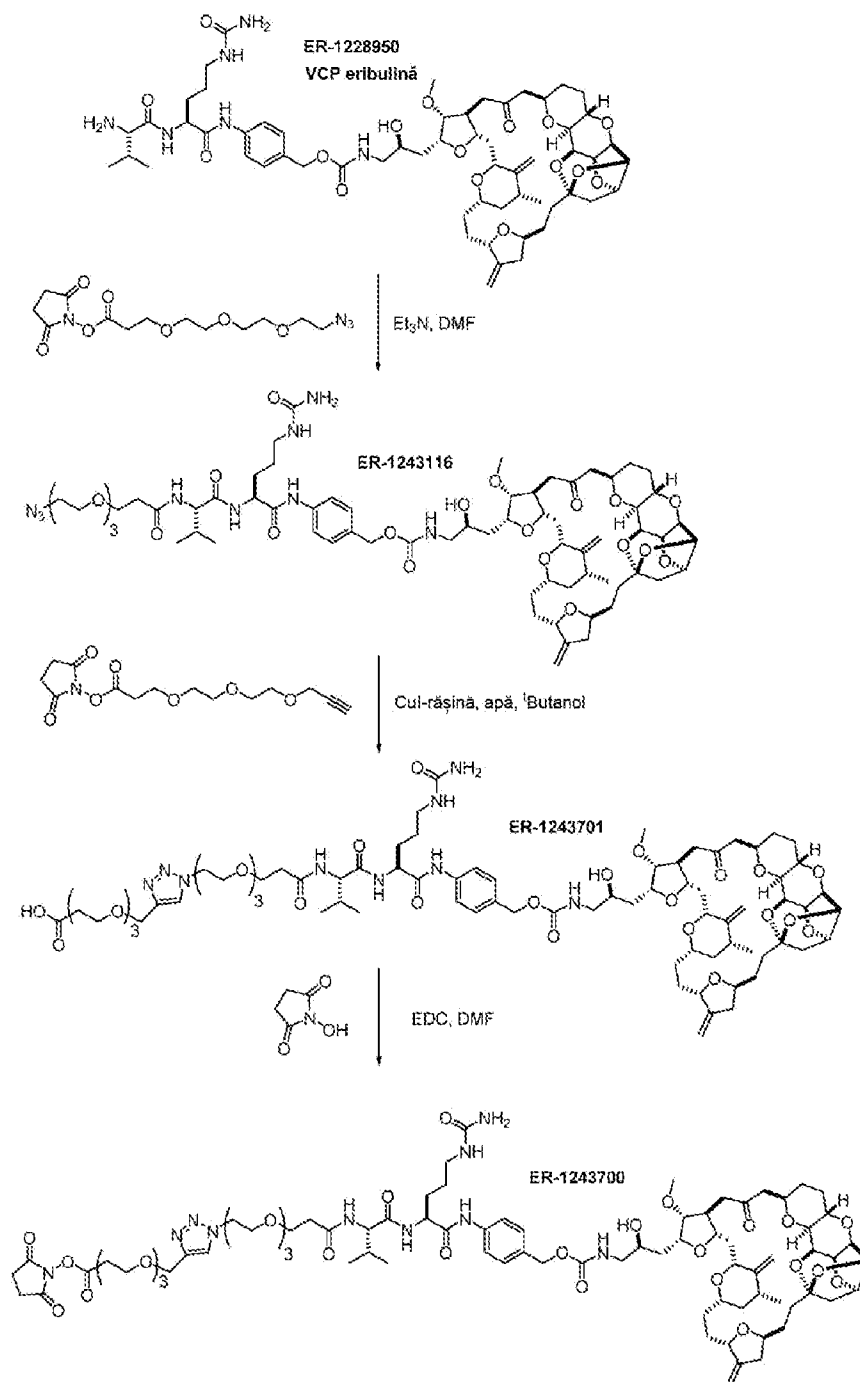
VCP-eribulină (ER-001228950) (10 mg, 8,808 μmol) și 2,5-dioxopiperidin-1-il 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)-3-oxo-7,10,13,16,19,22,25,28-octaosa-4-azahentriacontan-31-oat (6,07 mg, 8,808 μmol) au fost amestecate în DMF (1 mL), după care a urmat adăugarea de Et_3N (9,82 μl , 0,07 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 18 ore până când analiza HPLC a indicat finalizarea reacției. Solventul a fost îndepărtat prin evaporare, și reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă pentru a rezulta Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001242287) sub forma unui solid de culoare albă (3,0 mg, randament 20%). ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,58 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,29 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,80 (s, 2H), 5,12 (s, 1H), 5,04 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 5,01 (s, 1H), 4,99 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,80 (s, 1H), 4,69 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,59 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,50 - 4,42 (m, 2H), 4,32 - 4,24 (m, 2H), 4,20 - 4,14 (m, 2H), 4,12 - 4,04 (m, 3H), 3,96 (t, $J = 10,4$ Hz, 1H), 3,86 - 3,80 (m, 3H), 3,76 - 3,57 (m, 4H), 3,48 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 3,36 (s, 3H), 3,20 - 3,08 (m, 3H), 2,91 (dd, $J = 2,0, 11,2$ Hz, 1H), 2,90 - 2,82 (m, 1H), 2,74 - 2,60 (m, 2H), 2,44 - 2,29 (m, 5H), 2,21 - 1,97 (m, 10H), 1,93 - 1,83 (m, 3H), 1,79 - 1,20 (m, 19H), 1,09 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,04 - 0,98 (m, 1H), 0,99 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,97 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), LCMS ($\text{M}+\text{H}$) = 1711,6.

1.6 Preparare de NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001242288)



NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001242288) s-a preparat (13 mg, randament 85%) din VCP-eribulină (ER-001228950) și BisNHS-PEG9 utilizand aceeași procedură ca aceea descrisă mai sus pentru prepararea de NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001236940). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7,61 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,32 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,16 (s, 1H), 5,06 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,01 (s, 1H), 5,00 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,71 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,61 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,52 - 4,45 (m, 2H), 4,34 - 4,26 (m, 2H), 4,20 - 4,19 (m, 1H), 4,14 - 4,06 (m, 2H), 3,98 (t, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,88 - 3,80 (m, 3H), 3,76 - 3,70 (m, 4H), 3,66 - 3,58 (m, 37H), 3,38 (s, 3H), 3,24 - 3,10 (m, 3H), 2,93 (dd, *J* = 2,0, 11,2 Hz, 1H), 2,91 - 2,84 (m, 1H), 2,84 (s, 4H), 2,76 - 2,64 (m, 2H), 2,58 - 2,50 (m, 4H), 2,46 - 2,28 (m, 5H), 2,22 - 1,96 (m, 8H), 1,91 - 1,82 (m, 3H), 1,79 - 1,68 (m, 5H), 1,64 - 1,24 (m, 8H), 1,11 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,08 - 0,96 (m, 1H), 0,99 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 0,97 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), LCMS (M+H) = 1729,7.

1.7 Preparare de NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001243700)



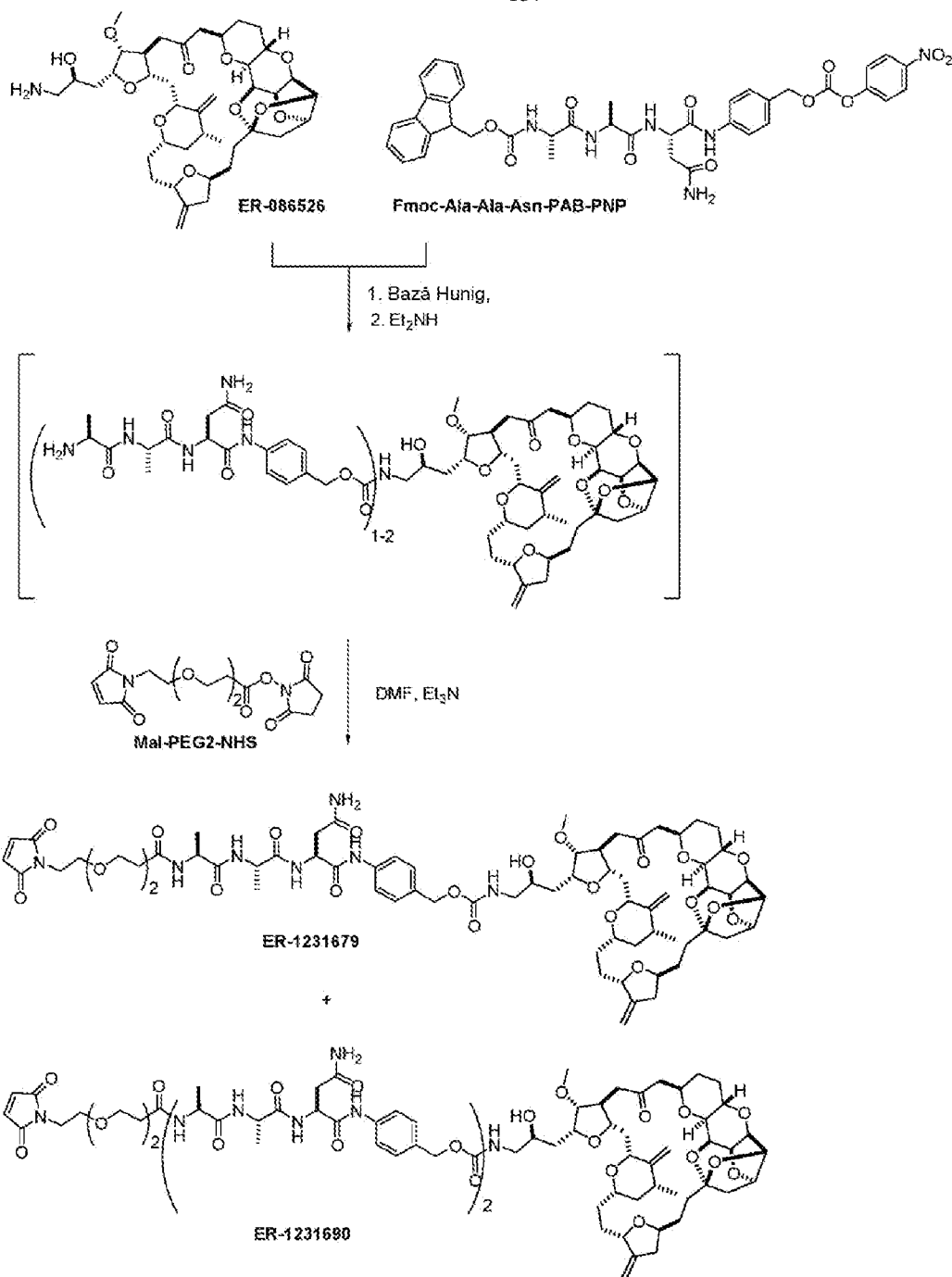
In DMF (2,5 mL) s-a dizolvat VCP-eribulină (ER-001228950) (25 mg, 0,022 mmol), și apoi s-a amestecat cu Et₃N (24,55 μl, 0,176 mmol) și Azidă-PEG3-NHS (8,34 mg, 0,024 mmol). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 18 ore până când analiza HPLC a indicat finalizarea reacției. Amestecul a fost concentrat sub vid, și reziduul a fost purificat prin prep-HPLC (MeCN și apă cu acid formic 0,1%). Frațiunile care conțin azidă-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulină au fost extrase cu diclorometan (CH₂Cl₂) (3 x 20 mL), și CH₂Cl₂ a fost evaporat pentru a obține azidă-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001243116) sub forma unui solid de culoare albă (18,9 mg, randament 63%). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 7,58 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,30 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 5,04 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,03 (s, 1H), 5,01 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 4,85 (s, 1H), 4,81 (s, 1H), 4,70 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,61 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,52 - 4,48 (m, 2H), 4,31 -

4,25 (m, 2H), 4,20 - 4,15 (m, 1H), 4,13 - 4,07 (m, 2H), 3,99 (t, $J = 10,4$ Hz, 1H), 3,84 - 3,79 (m, 3H), 3,77 - 3,65 (m, 4H), 3,64 - 3,56 (m, 13H), 3,38 (s, 3H), 3,20 - 3,05 (m, 3H), 2,95 - 2,80 (m, 2H), 2,75 - 2,60 (m, 2H), 2,55 - 2,50 (m, 2H), 2,43 - 2,25 (m, 5H), 2,21 - 1,97 (m, 8H), 1,93 - 1,83 (m, 3H), 1,79 - 1,72 (m, 5H), 1,68 - 1,29 (m, 10H), 1,08 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,05 - 0,95 (m, 1H), 0,98 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,95 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), LCMS (M+H) = 1365,1.

Azidă-PEG3-VCP-eribulină (ER-001243116) (9,6 mg, 7,035 μ mol) și 3-(2-(2-(prop-2-in-1-iloxi)etoxi)etoxi)propanoat de 2,5-dioxopirolidin-1-il (6,61 mg, 0,021 mmol) au fost amestecate în apă (0,6 mL) și t-Butanol (1,8 mL). Amestecul a fost barbotat cu N_2 timp de 45 de min. La amestec s-a adăugat iodură de cupru pe amberlyst-21 (1,23 mmol/g, 10 mg) și prin amestec a fost barbotat N_2 timp de alte 30 de min. Amestecul de reacție a fost apoi agitat la temperatura camerei timp de 72 de ore până la consumul complet al materiei prime. Prin analiza LCMS nu s-a observat niciun produs ester NHS dorit, doar acidul carboxilic hidrolizat. Amestecul a fost filtrat printr-un strat scurt de celite pentru a îndepărta rășina CuI. Filtratul a fost concentrat in vid, iar reziduul rezultat a fost purificat prin cromatografie în strat subțire preparativă (prep-TLC) (20% MeOH/ CH_2Cl_2) pentru a obține acid-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001243701) sub forma unui solid de culoare albă (3,7 mg, randament 33%). LCMS (ES) (M+H) = 1581,2.

Acid-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001243701) (3,0 mg, 1,898 μ mol) a fost dizolvat în DMF (200 μ L) și s-a adăugat 1-hidroxipirolidin-2,5-dionă (0,437 mg, 3,796 μ mol), după care a urmat adăugarea de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimidă (EDC) (0,728 mg, 3,796 μ mol). Reacția a fost aproximativ 50% completă după agitare la temperatura camerei timp de 18 ore. S-a adăugat EDC (1,46 mg, 7,8 μ mol), și amestecul a fost agitat timp de încă 18 ore până când analiza HPLC a indicat o conversie > 95% la NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulină. Amestecul a fost concentrat in vid, și reziduul a fost purificat prin prep-TLC (15% MeOH/ CH_2Cl_2) pentru a rezulta NHS-PEG3-triazol-PEG3-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001243700) sub forma unui solid de culoare albă (2,2 mg, randament 69%). 1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 8,00 (s, 1H), 7,59 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,31 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,04 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,00 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 4,71 (t, $J = 4,0$ Hz, 1H), 4,63 (s, 2H), 4,61 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,57 - 4,55 (m, 2H), 4,51 - 4,45 (m, 1H), 4,32 - 4,28 (m, 2H), 4,21 - 4,17 (m, 2H), 4,13 - 4,10 (m, 2H), 3,98 (t, $J = 10,8$ Hz, 1H), 3,88 - 3,80 (m, 5H), 3,75 - 3,70 (m, 4H), 3,68 - 3,55 (m, 18H), 3,45 - 3,40 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,20 - 3,08 (m, 4H), 2,93 - 2,80 (m, 2H), 2,75 - 2,50 (m, 2H), 2,68 (s, 4H), 2,48 - 2,30 (m, 7H), 2,28 - 1,92 (m, 10H), 1,90 - 1,68 (m, 8H), 1,65 - 1,27 (m, 8H), 1,11 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,05 - 0,95 (m, 1H), 0,99 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H), 0,97 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), LCMS (M+H) = 1678,3.

1.8 Preparare de Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulină (ER-001231679) și Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulină (ER-001231690)



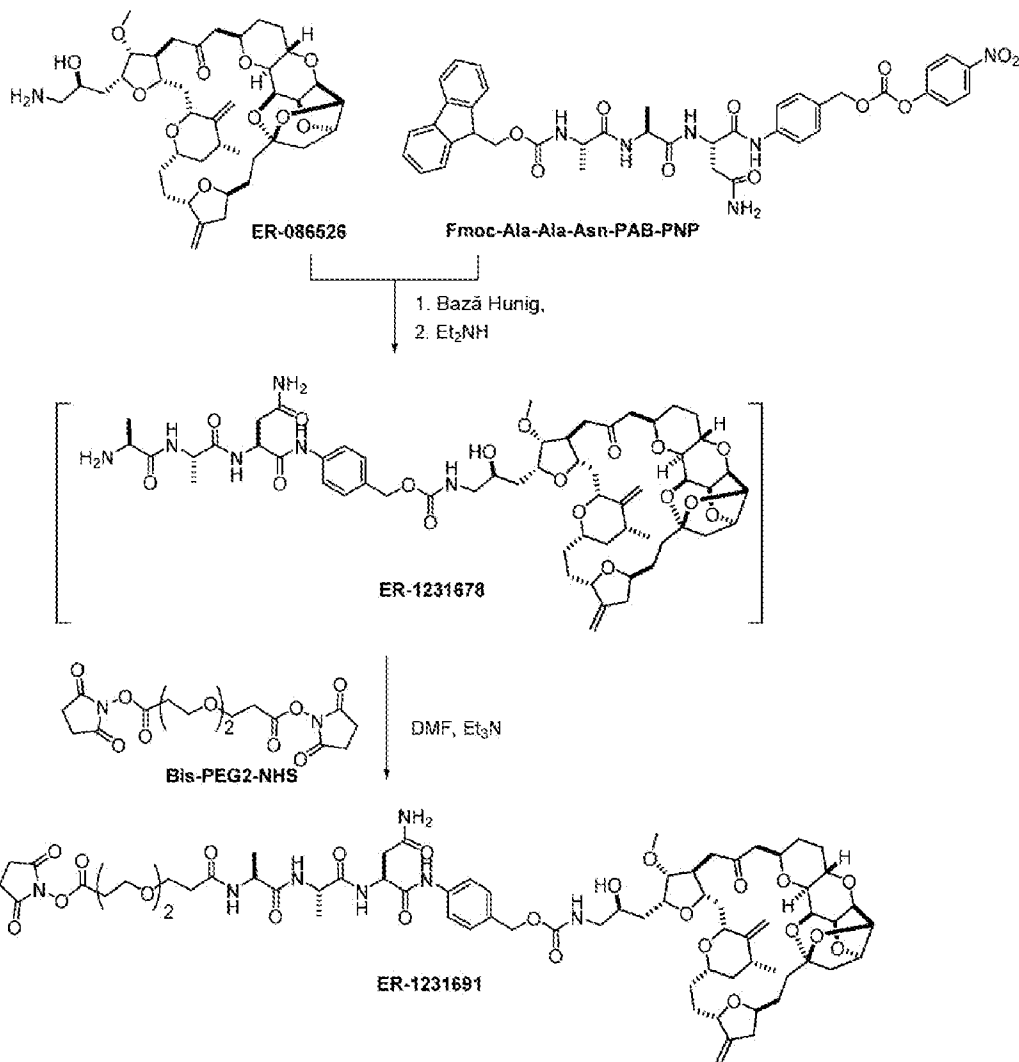
În DMF (0,5 mL) a fost dizolvată eribulină (ER-000086526) (10 mg, 0,014 mmol), și s-a amestecat cu bază Hunig (3,59 μ L, 0,021 mmol). A fost apoi adăugat ((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-amino-1-((4-((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)-1,4-dioxobutan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)carbamit de (9H-fluoren-9-il)metil (15,76 mg, 0,021 mmol), și soluția rezultată de culoare galbenă a fost agitată la temperatura camerei timp de 3 zile până când analiza HPLC a indicat consumul complet al materiei prime. La amestecul de reacție s-a adăugat dietilamină (14,23 μ L, 0,137 mmol), amestec care a fost apoi agitat la temperatura camerei o perioadă suplimentară de 2 ore până când a existat scindare 100% a protecției Fmoc. Amestecul de reacție a fost concentrat pentru a îndepărta dietilamina, și reziduul a fost re-dizolvat în DMF (1,5 mL). S-a adăugat Et₃N (0,015 mL, 0,11 mmol) la temperatura camerei, după care

a urmat adăugarea de 3-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)etoxi)etoxi)propanoat de 2,5-dioxopirolidin-1-il (9,71 mg, 0,027 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 16 ore până când reacția a fost completă, așa cum a fost determinat prin analiza LCMS. Amestecul a fost concentrat sub vid înalt, și purificat prin cromatografie rapidă pentru a obține Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulină (ER-001231679) (9,2 mg, randament 49%) și Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulină (ER-001231690) (6,0 mg, randament 18%) sub formă de uleiuri incolore.

Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulină (ER-001231679): ^1H RMN (400 MHz) δ ppm 9,23 (s, 1H), 8,00 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,61 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,38 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 7,24 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,13 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 6,68 (s, 2H), 6,30 (s, 1H), 6,04 - 6,00 (m, 1H), 5,77 (s, 1H), 5,42 (s, 1H), 5,07 (s, 1H), 5,06 - 4,98 (m, 2H), 4,93 (s, 1H), 4,88 (s, 1H), 4,90 - 4,82 (m, 1H), 4,80 (s, 1H), 4,69 (t, $J = 4,0$ Hz, 1H), 4,60 (t, $J = 4,0$ Hz, 1H), 4,49 - 4,42 (m, 1H), 4,38 - 4,25 (m, 4H), 4,19 (t, $J = 4,8$ Hz, 1H), 4,15 - 4,08 (m, 1H), 4,03 (t, $J = 4,8$ Hz, 1H), 3,97 - 3,85 (m, 3H), 3,83 - 3,50 (m, 12H), 3,41 (s, 3H), 3,50 - 3,10 (m, 3H), 3,02 - 2,64 (m, 6H), 2,52 - 2,30 (m, 7H), 2,30 - 1,65 (m, 14H), 1,65 - 1,20 (m, 12H), 1,10 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,13 - 1,05 (m, 1H), LCMS (M+Na) = 1396,6.

Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-eribulină (ER-001231690): ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,65 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,60 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,28 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,23 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 6,79 (s, 2H), 5,13 (s, 1H), 5,02 (s, 1H), 5,06 - 4,98 (m, 4H), 4,87 (s, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,85 - 4,72 (m, 2H), 4,71 (t, $J = 4,8$ Hz, 1H), 4,61 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,47 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H), 4,30 - 4,06 (m, 9H), 3,97 (t, $J = 4,8$ Hz, 1H), 3,89 - 3,80 (m, 3H), 3,75 - 3,48 (m, 12H), 3,38 (s, 3H), 3,17 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,94 - 2,62 (m, 8H), 2,50 - 2,28 (m, 7H), 2,22 - 1,65 (m, 14H), 1,58 - 1,30 (m, 18H), 1,10 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,06 - 0,97 (m, 1H), LCMS (M+Na) = 1802,8.

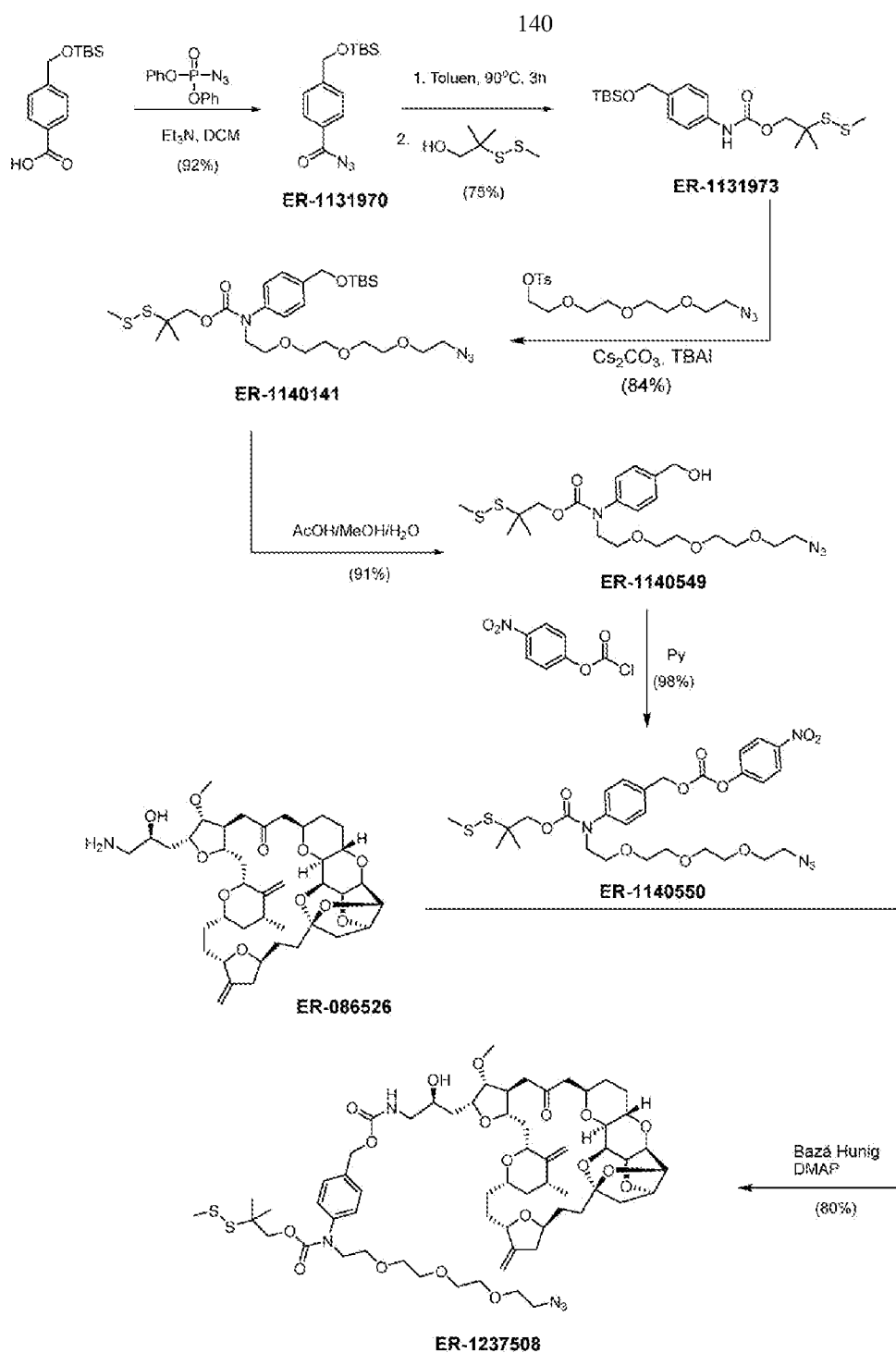
1.9 Preparare de NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulină (ER-001231691)



Ala-Ala-Asn-PAB-eribulină (ER-001231678) s-a preparat (15 mg, randament cantitativ) din eribulină (ER-000086526) și Fmoc-Ala-Ala-Asn-PAB-PNP utilizand aceeași procedură ca aceea descrisă mai sus pentru prepararea de Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001228950). LCMS (M+H)=1135,5.

NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-eribulină (ER-001231691) s-a preparat (12,4 mg, randament 64%) din Ala-Ala-Asn-PAB-eribulină (ER-001231678) și BisNHS-PEG2 utilizand aceeași procedură ca aceea descrisă mai sus pentru prepararea de NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001236940). ¹H RMN (400 MHz) δ ppm 9,21 (s, 1H), 7,95 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,62 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,58 - 7,52 (m, 1H), 7,28 (s 1, 1H), 7,24 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,10 (s 1, 1H), 6,29 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H), 5,83 (s 1, 1H), 5,38 (s 1, 1H), 5,07 (s, 1H), 5,05 - 4,95 (m, 2H), 4,93 (s, 1H), 4,88 (s, 1H), 4,90 - 4,83 (m, 1H), 4,81 (s, 1H), 4,69 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,60 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H), 4,46 - 4,41 (m, 1H), 4,36 - 4,25 (m, 4H), 4,19 (dd, *J* = 4,8, 6,0 Hz, 1H), 4,15 - 4,09 (m, 1H), 4,03 (dd, *J* = 4,8, 6,0 Hz, 1H), 3,99 - 3,89 (m, 3H), 3,85 - 3,50 (m, 10H), 3,41 (s, 3H), 3,40 - 3,10 (m, 3H), 3,01 - 2,60 (m, 10H), 2,60 - 2,35 (m, 7H), 2,35 - 1,65 (m, 14H), 1,65 - 1,20 (m, 14H), 1,10 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,15 - 1,03 (m, 1H), LCMS (ES) (M+H) = 1442,7.

1.10 Preparare de azidă-PEG3-disulfură-PAB-eribulină (ER-001237508)



Acid 4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)benzoic (1,0 g, 3,754 mmol) a fost dizolvat în diclorometan (DCM) (25 mL) răcit la 0°C . S-a adăugat apoi trietilamină (0,549 mL, 3,941 mmol), urmată de fosforazidat de difenil (1,085 mg, 3,941 mmol). Amestecul de reacție a fost încălzit lent la temperatura camerei și agitat timp de 14 ore. Amestecul brut a fost diluat cu acetat de etil (EtOAc)/Hep (1:1, 100 mL), și a fost trecut printr-un dop scurt de silice eluând cu EtOAc/Hep (50%). Solventul a fost îndepărtat sub vid pentru a rezulta 1,10 g de azidă de 4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)benzoil (ER-001131970). ^1H RMN (400 MHz) δ ppm 7,98 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz), 7,40 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz), 4,79 (s, 2 H), 0,94 (s, 9 H), 0,10 (s, 6 H).

Azidă de 4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)benzoi (ER-001131970) (1,1 g, 3,775 mmol), dizolvată în toluen (20 mL), a fost încălzită la 110°C timp de 3 ore. Cu toate că produsul nu a arătat ca o singură pată, analiza prin cromatografie în strat subțire (TLC) a indicat că materia primă a fost consumată. Amestecul de reacție a fost apoi răcit la temperatura camerei, și transferat într-un flacon sigilat sub azot și depozitat sub formă de soluție în toluen (1 mL = 32,6 mg) la -20°C.

S-a adăugat trietilamină (0,099 mL, 0,709 mmol) la o soluție de tert-butil((4-izocianatobenzil)oxi)dimetilsilan (165 mg, 0,626 mmol) în toluen (5 mL), urmată de alcool (90,0 mg, 0,591 mmol), și amestecul de reacție a fost agitat timp de 6 ore la 36°C. Progresul reacției a fost monitorizat prin UPLC/MS. S-a adăugat apoi o soluție saturată de hidrogen carbonat de sodiu (NaHCO₃) (10 mL), s-a extras cu EtOAc/Hep (1:1, 60 mL), s-a spălat cu soluție salină, s-a uscat pe sulfat de sodiu, și s-a concentrat. Materialul brut a fost purificat prin cromatografie rapidă (EtOAc/Hep 10% până la 40%) pentru a obține 215 mg de 2-metil-2-(metildisulfanil)propil(4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)carbamate (ER-001131973). ¹H RMN (400 MHz) δ ppm 7,34 (d, 2 H, *J* = 8,4 Hz), 7,26 (d, 2 H, *J* = 7,6 Hz), 6,63 (s l, 1 H), 4,69 (s, 2 H), 4,17 (s, 2 H), 2,42 (s, 3 H), 1,35 (s, 6 H), 0,93 (s, 9 H), 0,08 (s, 6 H).

2-metil-2-(metildisulfanil)propil (4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)carbamate (ER-001131973) (198 mg, 0,476 mmol) și 4-metilbenzenesulfonat de 2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil (325 mg, 0,87 mmol) s-au dizolvat în DMF (6,6 mL). S-a adăugat apoi carbonat de cesiu (621 mg, 1,905 mmol), urmat de iodură de tetrabutilamoniu (45 mg, 0,122 mmol), și amestecul de reacție a fost agitat timp de 15 ore la 36°C. Progresul reacției a fost monitorizat prin UPLC/MS. S-a adăugat apoi o soluție saturată de NH₄Cl (30 mL), s-a extras cu EtOAc/Hep (2:1, 150 mL), s-a spălat cu soluție salină (10 mL), s-a uscat pe sulfat de sodiu, și s-a concentrat sub vid. Materialul brut a fost purificat prin cromatografie rapidă (EtOAc/Hep 20% până la 50%) pentru a obține 248 mg de (2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)carbamate de 2-metil-2-(metildisulfanil)propil (ER-001140141). ¹H RMN (400 MHz) δ ppm 7,28 (d, 2 H, *J* = 8,4 Hz), 7,20 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 4,73 (s, 2 H), 4,06 (s l, 2 H), 3,83 (dd, 2 H, *J* = 6,4, 5,6 Hz), 3,68 - 3,56 (m, 12 H), 3,37 (dd, 2 H, *J* = 5,6, 5,2 Hz), 2,33 (s, 3 H), 1,14 (s l, 6 H), 0,93 (s, 9 H), 0,09 (s, 6 H).

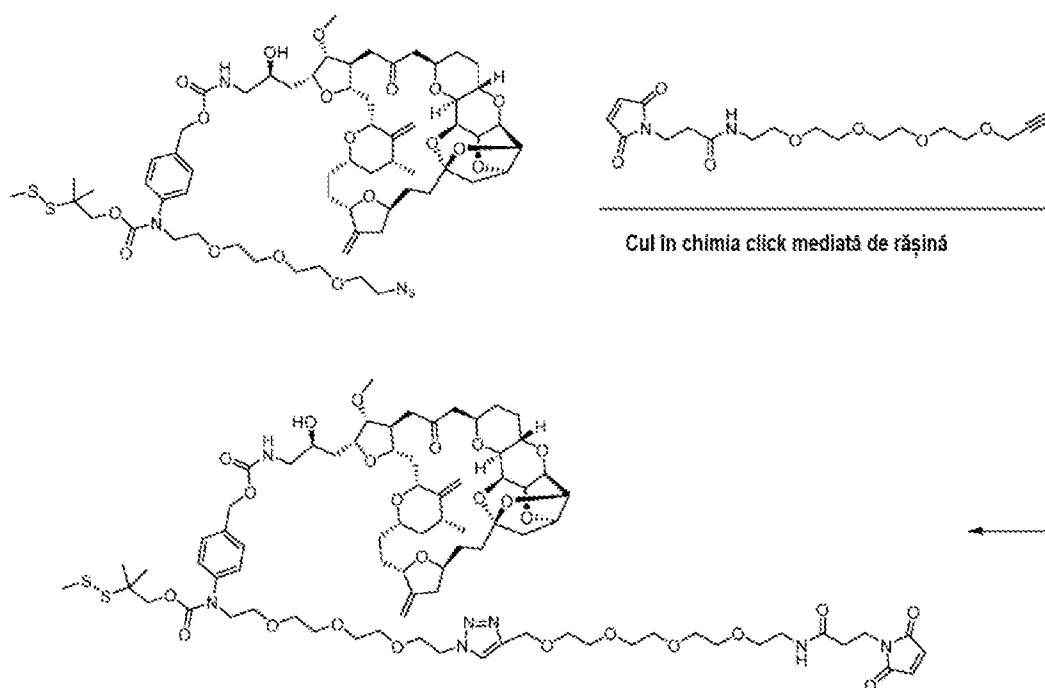
(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)carbamate de 2-metil-2-(metildisulfanil)propil (ER-001140141) (81 mg, 0,131 mmol) a fost dizolvat într-un amestec de metanol (5 mL) și apă (0,5 mL). La amestecul de reacție s-a adăugat apoi acid acetic (0,5 mL, 8,734 mmol), și s-a agitat timp de 14 ore la 38°C. Amestecul de reacție a fost răcit la temperatura camerei, și solventul a fost îndepărtat sub vid. Reziduul a fost diluat cu EtOAc (30 mL), spălat cu apă (2 X 5 mL), NaHCO₃, și soluție salină (3 mL), uscat pe sulfat de sodiu, și concentrat sub vid. Materialul brut a fost purificat prin cromatografie rapidă (EtOAc/Hep 30% până la 90%) pentru a obține 61,0 mg de (2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-(hidroximetil)fenil)carbamate de 2-metil-2-(metildisulfanil)propil (ER-001140549). ¹H RMN (400 MHz) δ ppm 7,34 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 7,26 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 4,69 (d, 2 H, *J* = 4,4 Hz), 4,06 (s l, 2 H), 3,84 (dd, 2 H, *J* = 6,2, 6,2 Hz), 3,66 - 3,56 (m, 12 H), 3,37 (dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2 Hz), 2,33 (s, 3 H), 1,74 (s l, 1 H), 1,14 (s l, 6 H).

(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-(hidroximetil)fenil)carbamate de 2-metil-2-(metildisulfanil)propil (ER-001140549) (60 mg, 0,119 mmol) a fost dizolvat în DCM (2 mL) și Py (0,019 mL, 0,239 mmol) răcit la 0°C. S-au adăugat apoi carbonocloridat de 4-nitrofenil (38,5 mg, 0,191 mmol) în DCM (2 mL) și dimetilaminopiridină (DMAP) (2,9 mg, 0,024 mmol), și amestecul de reacție a fost agitat timp de 30 min la 0°C. Amestecul de reacție a fost încălzit lent la temperatura camerei, și agitat până când a fost consumată materia primă (aproximativ 2,5 ore). Solventul a fost apoi îndepărtat sub vid, și reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (EtOAc/Hep 10% până la 35%) pentru a obține 78 mg de (2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamate de 2-metil-2-(metildisulfanil)propil (ER-001140550). ¹H RMN (400 MHz) δ ppm 8,27 (dd, 2 H, *J* = 6,8, 2,4 Hz), 7,41 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 7,37 (dd, 2 H, *J* = 7,2, 2,4 Hz), 7,33 (d, 2 H, *J* = 8,8 Hz), 5,27 (s, 2 H), 4,08 (s l, 2 H), 3,85 (dd, 2 H, *J* = 5,8, 5,8 Hz), 3,66 - 3,57 (m, 12 H), 3,36 (dd, 2 H, *J* = 5,2, 5,2 Hz), 2,33 (s l, 3 H), 1,19 (s l, 6 H).

(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)(4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)carbamate de 2-metil-2-(metildisulfanil)propil (ER-001140550) (30 mg, 0,045 mmol) în DCM (3 mL, 46,625 mmol) a fost plasat într-un balon de 25 mL sub azot, și a fost răcit la 0°C. S-au adăugat amină (40,8 mg, 0,049 mmol) în DCM (2 mL) și bază Hunig (0,024 mL, 0,135 mmol), urmate de DMAP (1,4 mg, 0,011 mmol). Amestecul de reacție a fost apoi încălzit lent la temperatura camerei, agitat timp de 3 ore, concentrat sub vid, și purificat prin cromatografie rapidă (EtOAc/Hep 50% până la 100%, urmat de MeOH/EtOAc 3% până la 8%) pentru a obține 45,0 mg de azidă-PEG3-disulfură-PAB-eribulină pură (ER-001237508). ¹H RMN (400 MHz) δ ppm 7,32 (d, 2 H, *J* = 8,0 Hz), 7,25 (d, 2 H, *J* = 7,2 Hz), 5,28 (dd, 1 H, *J* = 5,6, 5,6 Hz), 5,11 - 5,04 (m, 3 H), 4,93

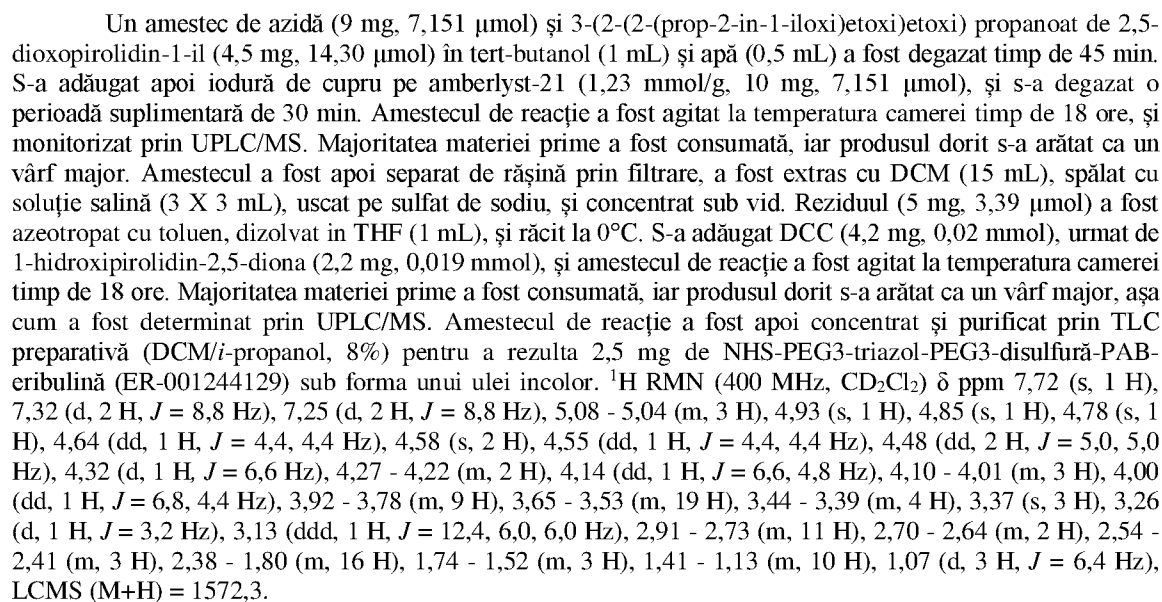
(s, 1 H), 4,88 (s, 1 H), 4,81 (s, 1 H), 4,69 (dd, 1 H, $J = 4,4, 4,4$ Hz), 4,60 (dd, 1 H, $J = 4,2, 4,2$ Hz), 4,36 (s, 1 H), 4,33 (dd, 1 H, $J = 4,0, 2,0$), 4,29 (ddd, 1 H, $J = 9,6, 4,4, 4,4$ Hz), 4,18 (dd, 1 H, $J = 6,4, 4,4$ Hz), 4,14 - 4,04 (m, 3 H), 4,03 (dd, 1 H, $J = 6,4, 4,4$ Hz), 3,97 - 3,89 (m, 3 H), 3,84 - 3,78 (m, 3 H), 3,67 - 3,56 (m, 14 H), 3,42 (s, 3 H), 3,40 - 3,35 (m, 1 H), 3,37 (dd, 2 H, $J = 5,2, 5,2$ Hz), 3,27 (d, 1 H, $J = 3,2$ Hz), 3,20 (ddd, 1 H, $J = 12,8, 6,0, 6,0$ Hz), 2,91 - 2,83 (m, 2 H), 2,70 (dd, 1 H, $J = 16,0, 10,0$ Hz), 2,52 - 2,40 (m, 3 H), 2,35 - 2,13 (m, 9 H), 2,10 - 2,06 (m, 1 H), 2,01 - 1,89 (m, 4 H), 1,78 - 1,64 (m, 4 H), 1,60 - 1,52 (m, 4 H), 1,49 - 1,28 (m, 5 H), 1,22 - 1,07 (m, 6 H), 1,09 (d, 3 H, $J = 6,0$ Hz).

1.11 Preparare de Mal-PEG4-triazol-PEG3-disulfură-PAB-eribulină (ER-001237504)

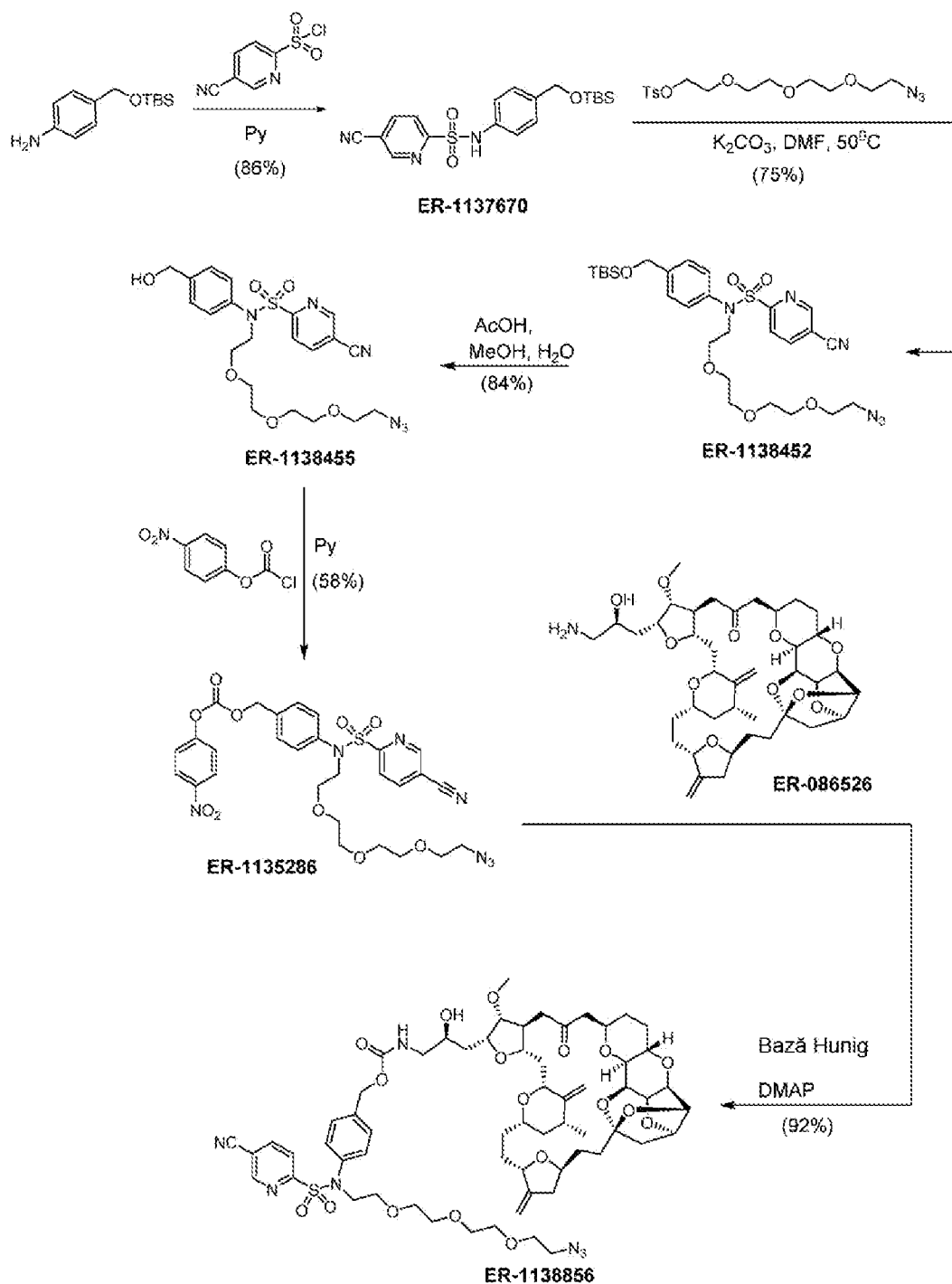


Un amestec de azidă (9,0 mg, 7,151 μ mol) și 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)-N-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-il)propanamidă (6,8 mg, 0,018 mmol) în tert-butanol (1,5 mL) și apă (0,5 mL) a fost degazat timp de 45 min. S-a adăugat apoi iodură de cupru pe amberlyst-21 (1,23 mmol/g, 10 mg), și s-a degazat o perioadă suplimentară de 30 min. Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 18 ore, și monitorizat prin UPLC/MS. Majoritatea materiei prime a fost consumată, iar produsul dorit s-a arătat ca un vârf major. Amestecul a fost apoi separat de rășină, și a fost purificat prin HPLC (acetonitril/apă cu acid formic 0,05%) pentru a obține 1,5 mg de Mal-PEG4-triazol-PEG3-disulfură-PAB-eribulină (ER-001237504). ^1H RMN (400 MHz) δ ppm 7,74 (s, 1 H), 7,32 (d, 2 H, $J = 8,4$ Hz), 7,27 - 7,25 (m, 2 H), 6,69 (s, 1, 2 H), 5,43 (dd, 1 H, $J = 5,6, 5,6$ Hz), 5,14 - 5,06 (m, 3 H), 4,95 (s, 1 H), 4,89 (s, 1 H), 4,82 (s, 1 H), 4,70 (dd, 1 H, $J = 4,4, 4,4$ Hz), 4,66 (s, 2 H), 4,62 (dd, 1 H, $J = 4,4, 4,4$ Hz), 4,52 (dd, 1 H, $J = 5,2, 5,2$ Hz), 4,38 - 4,31 (m, 2 H), 4,30 (ddd, 1 H, $J = 10,4, 4,0, 4,0$ Hz), 4,20 (dd, 1 H, $J = 6,4, 4,4$ Hz), 4,16 - 4,05 (m, 3 H), 4,04 (dd, 1 H, $J = 6,4, 4,4$ Hz), 3,99 - 3,91 (m, 3 H), 3,87 - 3,80 (m, 6 H), 3,70 - 3,59 (m, 22 H), 3,53 (dd, 2 H, $J = 5,2, 5,2$ Hz), 3,44 (s, 3 H), 3,43 - 3,36 (m, 3 H), 3,29 (d, 1 H, $J = 2,8$ Hz), 3,18 (ddd, 1 H, $J = 12,9, 6,2, 6,2$ Hz), 2,92 - 2,84 (m, 2 H), 2,72 (dd, 1 H, $J = 16,0, 10,0$ Hz), 2,54 - 2,42 (m, 5 H), 2,37 - 1,90 (m, 19 H), 1,78 - 1,52 (m, 3 H), 1,50 - 1,14 (m, 16 H), 1,10 (d, 3 H, $J = 6,0$ Hz), LCMS (M+H) = 1642,1.

1.12 Preparare de NHS-PEG3-triazol-PEG3-disulfură-PAB-eribulină (ER-001244129)



1.13 Preparare de azidă-PEG3-sulfonamidă-PAB-eribulină (ER-001138856)



4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)anilină (315 mg, 1,327 mmol) a fost dizolvată în DCM (10 mL) răcit la 0°C. S-a adăugat apoi piridină (0,268 mL, 3,317 mmol), urmată de clorură de 5-cianopiridină-2-sulfonil (365 mg, 1,801 mmol) în DCM (10 mL) pe parcursul a 15 min. Amestecul de reacție a fost încălzit lent la temperatura camerei pe parcursul a 1 oră, și a fost agitat timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu EtOAc (50 mL), a fost spălat cu soluție salină, uscat pe sulfat de sodiu, și concentrat sub vid pentru a obține 610 mg (103%) de N-(4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)-5-cianopiridină-2-sulfonamidă (ER-001137670). Produsul brut era destul de pur, deși colorat. 1H RMN (400 MHz) δ ppm 8,94 (dd, 1 H, $J = 1,8$,

0,6 Hz), 8,10 (dd, 1 H, $J = 8,4, 2,0$ Hz), 7,99 (dd, 1 H, $J = 8,0, 0,8$ Hz), 7,18 (d, 2 H, $J = 8,2$ Hz), 7,15 (s, 1 H), 7,11 (dd, 2 H, $J = 6,8, 0,8$ Hz), 4,64 (s, 2 H), 0,90 (s, 9 H), 0,05 (s, 6 H).

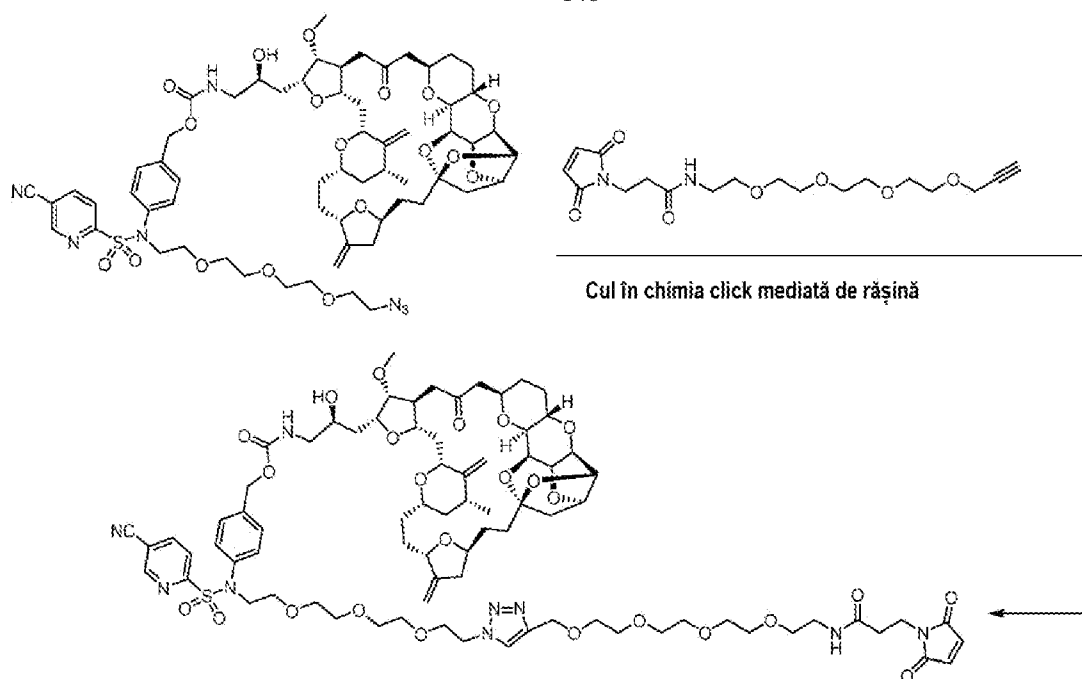
N-(4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)-5-cianopiridină-2-sulfonamidă (ER-001137670) (105,0 mg, 0,26 mmol) și 4-metilbenzenesulfonat de 2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil (143 mg, 0,383 mmol) au fost dizolvate în DMF (4 mL). S-a adăugat apoi carbonat de potasiu (K_2CO_3) (144 mg, 1,041 mmol), urmat de iodură de tetrabutilamoniu (19,2 mg, 0,052 mmol), și amestecul de reacție a fost agitat timp de 36 de ore la 50°C. Progresul reacției a fost monitorizat prin UPLC/MS. S-a adăugat o soluție saturată de NH_4Cl (10 mL), s-a extras cu EtOAc/Hep (2:1, 30 mL), s-a spălat cu soluție salină, s-a uscat pe sulfat de sodiu, și s-a concentrat. Materialul brut a fost purificat prin cromatografie rapidă (EtOAc/Hep 25% până la 80%) pentru a obține 118,0 mg de N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-N-(4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)-5-cianopiridină-2-sulfonamidă (ER-001138452) (75%). 1H RMN (400 MHz) δ ppm 8,99 (dd, 1 H, $J = 1,8, 0,6$ Hz), 8,08 (dd, 1 H, $J = 8,2, 2,2$ Hz), 7,86 (dd, 1 H, $J = 8,0, 0,8$ Hz), 7,24 (d, 2 H, $J = 10$ Hz), 7,09 (d, 2 H, $J = 8,8$ Hz), 4,69 (s, 2 H), 4,06 (dd, 2 H, $J = 6,0, 6,0$ Hz), 3,67 (dd, 2 H, $J = 5,2, 5,2$ Hz), 3,65 - 3,62 (m, 4 H), 3,58 (dd, 2 H, $J = 6,2, 6,2$ Hz), 3,56 - 3,53 (m, 4 H), 3,38 (dd, 2 H, $J = 5,2, 5,2$ Hz), 0,93 (s, 9 H), 0,08 (s, 6 H).

N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-N-(4-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)-5-cianopiridină-2-sulfonamidă (ER-001138452) (150 mg, 0,248 mmol) a fost dizolvată în metanol (6 mL). S-a adăugat apoi apă (0,60 mL), urmată de acid acetic (AcOH) (0,60 mL, 10,481 mmol). Amestecul de reacție a fost încălzit lent la 38°C, și agitat timp de 14 ore. Majoritatea solventului a fost îndepărtată sub vid. Reziduul a fost diluat cu EtOAc (30 mL), spălat cu apă (2 X 5 mL), $NaHCO_3$, și soluție salină, uscat pe sulfat de sodiu, și concentrat sub vid. Materialul brut a fost purificat prin cromatografie rapidă (EtOAc/Hep 35% până la 90%) pentru a obține 105,0 mg de N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-ciano-N-(4-(hidroximetil)fenil)piridină-2-sulfonamidă (ER-001138455) (84%). 1H RMN (400 MHz) δ ppm 8,99 (d, 1 H, $J = 1,2$ Hz), 8,09 (dd, 1 H, $J = 8,4, 2,0$ Hz), 7,88 (dd, 1 H, $J = 8,4, 0,8$ Hz), 7,30 (d, 2 H, $J = 8,8$ Hz), 7,15 (d, 2 H, $J = 8,4$ Hz), 4,67 (s, 2 H), 4,06 (dd, 2 H, $J = 6,2, 6,2$ Hz), 3,66 (dd, 2 H, $J = 5,0, 5,0$ Hz), 3,65 - 3,58 (m, 6 H), 3,55 - 3,51 (m, 4 H), 3,38 (dd, 2 H, $J = 5,2, 5,2$ Hz).

N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-ciano-N-(4-(hidroximetil)fenil)piridină-2-sulfonamidă (ER-001138455) (45 mg, 0,092 mmol) a fost dizolvată în DCM (3 mL), și răcită la 0°C după adăugarea de piridină (0,015 mL, 0,183 mmol). S-au adăugat apoi carbonocloridat de 4-nitrofenil (20,3 mg, 0,101 mmol) în DCM (2 mL) și DMAP (2,3 mg, 0,018 mmol). Amestecul de reacție a fost încălzit lent la temperatura camerei și agitat timp de 2 ore. UPLC/MS a indicat că au rămas unele materii prime. Amestecul de reacție a fost apoi concentrat sub vid, și purificat prin cromatografie rapidă (EtOAc/Hep 12% până la 40%) pentru a obține 35 mg de (4-nitrofenil)carbonat de 4-((N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-cianopiridină-2-sulfonamido)benzil (ER-001235286) (58%), și 20 mg de materie primă. 1H RMN (400 MHz) δ ppm 8,99 (d, 1 H, $J = 0,8$ Hz), 8,27 (dd, 2 H, $J = 9,2, 2,0$ Hz), 8,12 (dd, 1 H, $J = 7,6, 2,0$ Hz), 7,92 (d, 1 H, $J = 8,4$ Hz), 7,38 (d, 4 H, $J = 9,6$ Hz), 7,26 (d, 2 H, $J = 8,8$ Hz), 5,45 (s, 2 H), 4,06 (dd, 2 H, $J = 5,8, 5,8$ Hz), 3,67 - 3,58 (m, 8 H), 3,58 - 3,50 (m, 4 H), 3,38 (dd, 2 H, $J = 6,1, 6,1$ Hz).

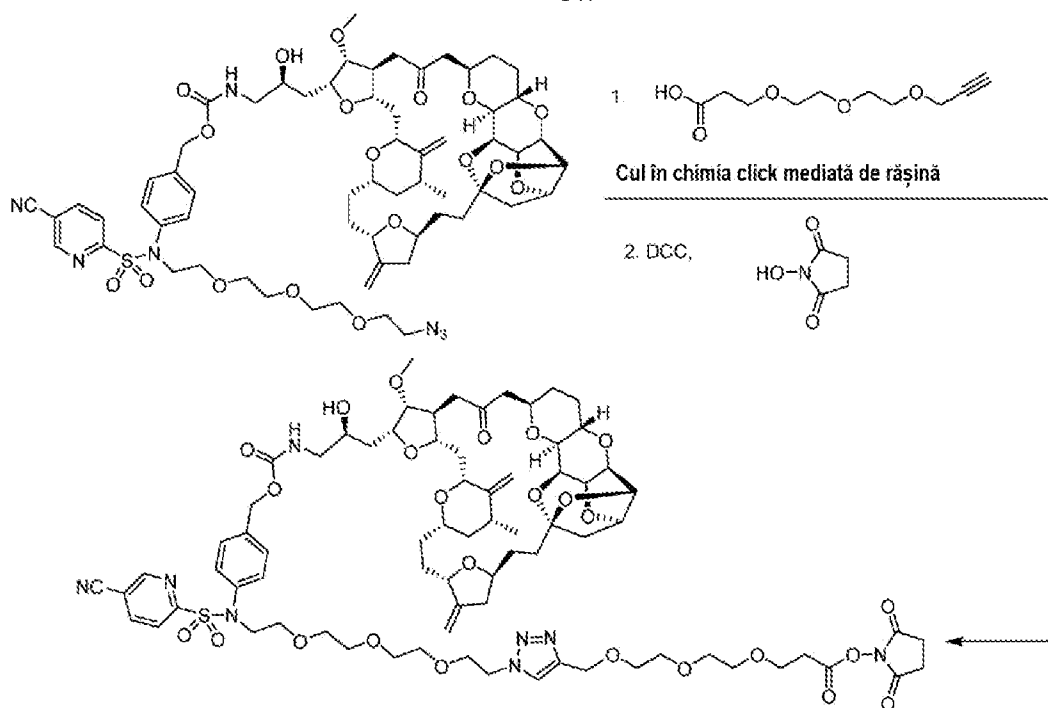
(4-nitrofenil)carbonat de 4-((N-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-5-cianopiridină-2-sulfonamido)benzil (ER-001235286) (35,0 mg, 0,053 mmol) a fost plasat într-un balon de 25 mL sub azot, și răcit la 0°C. S-au adăugat apoi amină (48,5 mg, 0,059 mmol) în DCM (3 mL, 46,625 mmol) și bază Hunig (0,037 mL, 0,214 mmol), urmate de DMAP (2,61 mg, 0,021 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat timp de 30 min la 0°C, și apoi agitat o perioadă suplimentară de 6 ore la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost concentrat sub vid, și purificat prin cromatografie rapidă (EtOAc/Hep 50% până la 100%, urmat de MeOH/EtOAc 3% până la 8%) pentru a obține 61,0 mg de azidă-PEG3-sulfonamidă-PAB-eribulină pură (ER-001138856). 1H RMN (400 MHz) δ ppm 8,98 (d, 1 H, $J = 1,2$ Hz), 8,10 (dd, 1 H, $J = 8,2, 1,8$ Hz), 7,87 (d, 1 H, $J = 8,0$ Hz), 7,26 (d, 2 H, $J = 6,8$ Hz), 7,13 (d, 2 H, $J = 8,4$ Hz), 5,29 (dd, 1 H, $J = 5,6, 5,6$ Hz), 5,08 - 5,00 (m, 3 H), 4,92 (s, 1 H), 4,87 (s, 1 H), 4,80 (s, 1 H), 4,68 (dd, 1 H, $J = 4,6, 4,6$ Hz), 4,59 (dd, 1 H, $J = 4,6, 4,6$ Hz), 4,38 - 4,30 (m, 2 H), 4,28 (ddd, 1 H, $J = 10,4, 4,0, 4,0$ Hz), 4,17 (dd, 1 H, $J = 6,2, 4,6$ Hz), 4,13 - 4,01 (m, 4 H), 3,97 - 3,88 (m, 3 H), 3,82 - 3,78 (m, 1 H), 3,67 - 3,50 (m, 15 H), 3,41 (s, 3 H), 3,40 - 3,33 (m, 1 H), 3,37 (dd, 2 H, $J = 4,8, 4,8$ Hz), 3,27 (d, 1 H, $J = 3,2$ Hz), 3,15 (ddd, 1 H, $J = 12,8, 6,4, 6,4$ Hz), 2,90 - 2,82 (m, 2 H), 2,70 (dd, 1 H, $J = 16,0, 10,0$ Hz), 2,51 - 2,40 (m, 3 H), 2,34 - 2,13 (m, 7 H), 2,10 - 2,05 (m, 1 H), 1,99 - 1,88 (m, 4 H), 1,78 - 1,64 (m, 5 H), 1,62 - 1,52 (m, 2 H), 1,50 - 1,29 (m, 4 H), 1,08 (d, 3 H, $J = 6,8$ Hz).

1.14 Preparare de Mal-PEG4-triazol-PEG3-sulfonamide-PAB-eribulină (ER-001237505)



Un amestec de azidă (10 mg, 8,023 μ mol) și 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirol-1-il)-N-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-il)propanamidă (9,20 mg, 0,024 mmol) în tert-butanol (2,1 mL) și apă (0,7 mL) a fost degazat timp de 45 min. S-a adăugat apoi iodură de cupru pe amberlyst-21 (1,23 mmol/g, 15 mg), și s-a degazat o perioadă suplimentară de 30 min. Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 18 ore, și a fost monitorizat prin UPLC/MS. Majoritatea materiei prime a fost consumată, iar produsul dorit s-a arătat ca un vârf major. Amestecul de reacție a fost apoi separat de rășină, și purificat prin TLC preparativă (DCM/metanol, 7%) pentru a rezulta 5,5 mg de Mal-PEG4-triazol-PEG3-sulfonamidă-PAB-cribulină (ER-001237505). ^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2) δ ppm 9,01 (s, 1 H), 8,15 (dd, 1 H, $J = 8,0, 1,8$ Hz), 7,87 (d, 1 H, $J = 8,0$ Hz), 7,75 (s, 1 H), 7,28 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz), 7,14 (d, 2 H, $J = 8,4$ Hz), 6,68 (s, 2 H), 6,47 (s, 1 H), 5,44 (s, 1 H), 5,10 - 5,02 (m, 3 H), 4,94 (s, 1 H), 4,86 (s, 1 H), 4,80 (s, 1 H), 4,68 (dd, 1 H, $J = 4,4, 4,4$ Hz), 4,59 (s, 2 H), 4,56 (dd, 1 H, $J = 4,4, 4,4$ Hz), 4,51 (dd, 2 H, $J = 5,2, 5,2$ Hz), 4,34 (d, 1 H, $J = 7,6$ Hz), 4,30 - 4,23 (m, 2 H), 4,19 - 4,14 (m, 2 H), 4,08 (dd, 1 H, $J = 4,0, 4,0$ Hz), 4,03 - 3,98 (m, 2 H), 3,94 - 3,72 (m, 8 H), 3,68 - 3,46 (m, 28 H), 3,38 (s, 3 H), 3,38 - 3,33 (m, 3 H), 3,27 (d, 1 H, $J = 3,2$ Hz), 3,16 - 3,02 (m, 2 H), 2,90 - 2,81 (m, 2 H), 2,68 (dd, 1 H, $J = 16,2, 9,8$ Hz), 2,54 - 2,40 (m, 7H), 2,40 - 1,8 (m, 11 H), 1,80 - 1,50 (m, 3 H), 1,48 - 1,25 (m, 3 H), 1,09 (d, 3 H, $J = 6,4$ Hz), LCMS (M+H) = 1630,0.

1.15 Preparare de NHS-PEG3-triazol-PEG3-sulfonamidă-PAB-cribulină (ER-001244623)



Un amestec de azidă (14 mg, 0,011 mmol) și 3-(2-(2-(prop-2-inoxi)etoxi)etoxi)propanoat de 2,5-dioxopirolidin-1-il (8,80 mg, 0,028 mmol) în terț-butanol (2 mL) și apă (1 mL) a fost degazat timp de 45 min. S-a adăugat apoi iodură de cupru pe amberlyst-21 (1.23 mmol/g, 20 mg), și s-a degazat o perioadă suplimentară de 30 min. Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 18 ore, și a fost monitorizat prin UPLC/MS. Majoritatea materiei prime a fost consumată, iar produsul dorit s-a arătat ca un vârf major. Amestecul de reacție a fost apoi separat de rășină prin extracție cu DCM (2 x 10 mL). Stratul DCM a fost spălat cu soluție salină (4 x 5 mL), uscat pe sulfat de sodiu, și concentrat la produsul dorit (care a fost utilizat în etapa următoare fără nicio purificare suplimentară).

Acid brut (15,0 mg, 10,255 μ mol) a fost dizolvat în THF (1,5 mL), și răcit la 0°C. S-a adăugat apoi DCC (15,2 mg, 0,074 mmol), urmat de 1-hidroxipirolidin-2,5-dionă (8,3 mg, 0,072 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 18 ore. UPLC/MS a indicat că majoritatea materiei prime a fost consumată, iar produsul dorit s-a arătat ca un vârf major. Amestecul de reacție a fost concentrat, și purificat prin TLC preparativă (DCM/*i*-propanol, 8%) pentru a rezulta 2,5 mg de NHS-PEG3-triazol-PEG3-sulfonamidă-PAB-eribulină (ER-001244623). ^1H RMN (400 MHz, CD_2Cl_2) δ ppm 9,00 (s, 1 H), 8,12 (d, 1 H, $J = 8,4$ Hz), 8,00 (d, 1 H, $J = 8,0$ Hz), 7,72 (s, 1 H), 7,26 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz), 7,12 (d, 2 H, $J = 8,0$ Hz), 5,37 (s, 1 H), 5,08 - 5,02 (m, 3 H), 4,93 (s, 1 H), 4,85 (s, 1 H), 4,78 (s, 1 H), 4,66 - 4,62 (m, 1 H), 4,58 - 4,56 (m, 4 H), 4,33 (d, 1 H, $J = 10,8$ Hz), 4,29 - 4,21 (m, 2 H), 4,10 - 3,96 (m, 4 H), 3,93 - 3,76 (m, 6 H), 3,74 - 3,44 (m, 27 H), 3,36 (s, 3 H), 3,34 - 3,24 (m, 2 H), 3,15 - 3,06 (m, 1 H), 2,97 (s, 1 H), 2,90 - 2,78 (m, 8 H), 2,74 - 2,08 (m, 13 H), 2,05 - 1,78 (m, 5 H), 1,73 - 1,50 (m, 2 H), 1,41 - 1,25 (m, 4 H), 1,07 (d, 3 H, $J = 6,0$ Hz), LCMS (M+H) = 1560,0.

1.16 Preparare de Mal-PEG2-eribulină

Eribulină (5 mg, 7 μ mol) a fost dizolvată în DMF (0,5 mL), și amestecată cu maleimido-PEG2-NHS (5 mg, 14 μ mol; Broadpharm, nr. cat. BP-21680) și bază Hunig (2,4 μ L, 14 μ mol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost apoi purificat prin HPLC (gradient apă-acetonitril 30-70% conținând acid formic 0,1%). Eluentul a fost colectat în masă, și liofilizat la sec. Randamentul final a fost de 3,7 mg (3,8 μ mol, 54%). Masa exactă anticipată a fost de 968,5 Da. Masa măsurată a fost de 969,6 Da [M+H].

1.17 Preparare de Mal-PEG4-eribulină

Eribulină (5 mg, 7 μ mol) a fost dizolvată în DMF (0,5 mL), și amestecată cu maleimido-PEG4-NHS (6,2 mg, 14 μ mol; Broadpharm, nr. cat. BP-20554) și bază Hunig (2,4 μ L, 14 μ mol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost apoi purificat prin HPLC

(gradient apă-acetonitril 30-70% conținând acid formic 0,1%). Eluentul a fost colectat în masă, și liofilizat la sec. Randamentul final a fost de 3,7 mg (3,5 μ mol, 50%). Masa exactă anticipată a fost de 1056,5 Da. Masa măsurată a fost de 1057,7 Da [M+H].

1.18 Preparare de azido-PEG2-eribulină

Eribulină (5 mg, 7 μ mol) a fost dizolvată în DMF (0,5 mL), și amestecată cu azido-PEG2-NHS (4,2 mg, 14 μ mol; Broadpharm, nr. cat. BP-20524) și bază Hunig (2,4 μ L, 14 μ mol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost apoi purificat prin HPLC (gradient apă-acetonitril 30-70% conținând acid formic 0,1%). Eluentul a fost colectat în masă, și liofilizat la sec. Randamentul final a fost de 2,2 mg (2,4 μ mol, 34%). Masa exactă anticipată a fost de 914,5 Da. Masa măsurată a fost de 915,7 Da [M+H].

1.19 Preparare de azido-PEG4-eribulină

Eribulină (5 mg, 7 μ mol) a fost dizolvată în DMF (0,5 mL), și amestecată cu azido-PEG4-NHS (5,5 mg, 14 μ mol; Broadpharm, nr. cat. BP-20518) și bază Hunig (2,4 μ L, 14 μ mol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost apoi purificat prin HPLC (gradient apă-acetonitril 30-70% conținând acid formic 0,1%). Eluentul a fost colectat în masă, și liofilizat la sec. Randamentul final a fost de 3,0 mg (3,0 μ mol, 43%). Masa exactă anticipată a fost de 1002,5 Da. Masa măsurată a fost de 1003,7 Da [M+H].

1.20 Preparare de azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulină

Eribulină (15 mg, 21 μ mol) a fost dizolvată în DMF (1,5 mL), și amestecată bine. Apoi s-au adăugat bază Hunig (5,5 μ L, 32 μ mol) și Fmoc-VCP-PNP (24 mg, 22 μ mol; Levena Biopharma, nr. cat. VC1003). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei pe parcursul nopții (16 ore). La finalizarea reacției, la amestecul de reacție a fost adăugată dietilamină (20 μ L, 0,21 mmol), și s-a agitat timp de 2 ore la temperatura camerei pentru a îndepărta gruparea de protecție Fmoc. Reacția de deprotejare a fost monitorizată utilizând un spectrometru de masă Waters SQD. La finalizarea reacției, amestecul de reacție a fost transferat într-un tub de microcentrifugă de 1,5 mL pre-cântărit. Solventul a fost evaporat sub vid folosind un concentrator Centrivap refrigerat cu temperatura setată la 30°C. Randamentul a fost de 16 mg (14 μ mol) de NH2-Val-Cit-pAB-eribulină brută (masa exactă 1134,6 Da, randament 67%).

NH2-Val-Cit-pAB-eribulină (16 mg, 14,1 μ mol) s-a dizolvat în DMF (1,5 mL). Apoi s-au adăugat bază Hunig (7,2 μ L, 41 μ mol) și azido-PEG4-NHS (11 mg, 28,2 μ mol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 3 ore. Amestecul de reacție a fost apoi purificat prin HPLC (gradient apă-acetonitril 48-72% conținând acid formic 0,1%). Eluentul a fost colectat la m/z 1409, și liofilizat pentru a permite obținerea de azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulină (masa exactă 1407,7 Da). S-au obținut 13 mg (9,2 μ mol) de azido-PEG4-Val-Cit-PAB-eribulină (randament de etapă 65%, 44% în total).

EXEMPLUL 4

1. Materiale și metode

Toți reactivii utilizați au fost obținuți de la furnizori comerciali la grad de cercetare sau mai mare, cu excepția cazului în care se indică în alt fel.

1.1 Anticorpi

MORAb-003 (anti-receptorul alfa al folatului uman umanizat, 25 mg/mL) și MORAb-009 (anti-mezotelină umană chimeric șoarece-uman, 25 mg/mL) utilizați în următoarele studii au fost din lotul #NB02962-19 și lotul #030A14, respectiv. Trastuzumab a fost obținut comercial (Clingen), și a fost din lotul #503345.

Anticorpii chimeric iepure-uman și anti-mezotelină umană umanizat având o cisteină neîmperecheată la LCys80 (Tabelul 1) au fost exprimați în celule 293F în mod tranzitoriu sau ca reuniuni selectate în mod stabil. Mediul condiționat a fost purificat și decisteinilat așa cum este descris în secțiunea 1.4.1.2.1.

1.2 Citotoxine

Compușii de eribulină care pot fi conjugați au fost sintetizați așa cum este descris în Exemplul 3 (Tabelul 46). Stocurile (10 mM) au fost preparate în DMSO și depozitate la -20°C până la utilizare.

1.3 Liniile celulare tumorale

Liniile de celule tumorale umane utilizate în analizele ADC-urilor MORAb-003, MORAb-009, și trastuzumab preparate cu compuși maleimido/succinimidă (OSu)/azido-linker-eribulină (Tabelul 46) includ IGROV1 (carcinom ovarian uman, FR^{hi}, MSLN^{neg}), NCI-H2110 (carcinom pulmonar cu celule non-mici uman, FR^{med}, MSLN^{med}), A431 (FR^{neg}, MSLN^{neg}), NCI-N87-luc (carcinom gastric uman, FR^{lo}, MSLN^{med}, her2^{hi}), NUGC3 (adenocarcinom gastric uman, FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{neg}), ZR75 (carcinom ductal de san uman, FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{med}), și BT-474 (carcinom ductal de san uman, FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{hi}). Liniile de

celule tumorale umane utilizate în analizele anticorpilor anti-mezotelină umană LCcys80 chimerici iepure-uman și umanizați conjugați cu MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001159569) au fost A3 (A431 transfectat stabil cu mezotelină umană, MSLN^{hi}), OVCAR3 (carcinom ovarian uman, MSLN^{hi}), HEC-251 (endometroid uman, MSLN^{med}), H226 (mezoteliom cu celule scuamoase pulmonar uman, MSLN^{lo}), și A431 parental (MSLN^{neg}). Toate liniile celulare utilizate au fost obținute direct de la American Type Culture Collection (ATCC), cu excepția IGROV1 (obținută de la National Cancer Institute, cu permisiune) și A3 (generată la Morphotek din A431 parental).

1.4 Conjugare anticorp-medicament

1.4.1 Conjugare pe bază de cisteină folosind maleimide

1.4.1.1 Conjugarea la disulfuri intercatenare

1.4.1.1.1 Reducere parțială

MORAb-003 și MORAb-009 au fost schimbați în tampon în soluție salină tamponată cu fosfat Dulbecco (DPBS) și apoi s-au concentrat la 20 mg/mL folosind concentrarea centrifugă. S-a adăugat un volum egal de 270 μM tris(2-carboxietil)fosfină (TCEP) în 1X DPBS cu EDTA 2 mM, și reducerea a fost efectuată prin amestecare ușoară timp de 80 min la temperatura camerei. Trastuzumab a fost redus parțial într-o manieră similară, cu excepția faptului că reducerea a fost efectuată prin amestecare ușoară timp de 40 de min. la temperatura camerei.

1.4.1.1.2 Conjugare

Compusul maleimido-linker-eribulină (în DMSO) a fost conjugat cu anticorpii parțial reduși la un raport molar de 1:6 (mAb:compus). Compusul a fost adăugat la propilen glicol la 50% în DPBS și amestecat profund. S-a adăugat apoi un volum egal de anticorp parțial redus, și s-a amestecat ușor (concentrație finală de propilen glicol de 25%). Conjugarea a continuat timp de 3,5 până la 4 ore la temperatura camerei.

1.4.1.2 Conjugarea la LCcys80

1.4.1.2.1 Decisteinilare

Folosind un ÄKTA Explorer (GE Healthcare), o coloană de proteină A (GE Healthcare) a fost echilibrată cu 10 volume de coloană (CV) de fosfat de sodiu 20 mM, EDTA 10 mM, pH 7,2 (tampon de echilibrare). Mediul condiționat a fost apoi încărcat, după care a urmat spălarea materialului nelegat cu 10 CV de tampon de echilibrare. Coloana a fost spălată cu 16 CV de fosfat de sodiu 20 mM, EDTA 10 mM, cisteină 5 mM, pH 7,2 la 0,5 mL/min timp de 16 ore pentru a îndepărta gruparea de acoperire. Coloana a fost apoi spălată cu 60 CV de Tris 20 mM, pH 7,5 la 0,5 mL/min timp de 60 de ore. Anticorpul decisteinilat a fost eluat utilizând 5 CV de glicină 0,1 M, pH 2,9 și neutralizat imediat folosind 5% volum de 2 M Tris, pH 9,0. Fraakțiile care conțin anticorpii au fost reunite și dializate în DPBS folosind un MWCO 20K Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher).

1.4.1.2.2 Conjugare

Anticorpul decisteinilat a fost adus la 5,0 mg/mL în DPBS, EDTA 1 mM, și propilen glicol la 50% a fost preparat în DPBS, EDTA 1 mM. MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001159569) (12 mM în DMSO) a fost adăugat la propilen glicol la 50% și amestecat bine. S-a adăugat apoi un volum egal de anticorp decisteinilat la un raport molar de 1:4 (mAb:compus), și s-a amestecat ușor. Conjugarea a continuat timp de 3,5 până la 4 ore la temperatura camerei.

1.4.2 Conjugarea pe bază de amină folosind succinimide

1.4.2.1 Conjugare

Anticorpul (MORAb-003 sau MORAb-009, neredus) a fost adus la 10,0 mg/mL în bicarbonat de sodiu 0,1 M, pH 8,3. Propilen glicol la 50% s-a preparat în bicarbonat de sodiu 0,1 M, pH 8,3. Succinimidă (OSu)-linker-eribulină (în DMSO) s-a adăugat la propilen glicol la 50% și s-a amestecat profund. Un volum egal de anticorp a fost apoi adăugat la un raport molar de 1:4 (mAb:compus) și amestecat profund. Conjugarea a continuat timp de 1 oră la temperatura camerei. Reakția de conjugare a fost stinsă cu adăugarea unui volum 1:20 de Tris 1 M, pH 8,0, și ADC a fost purificat așa cum este descris în secțiunea 1.4.4.

1.4.3 Conjugarea pe bază de amină în două etape utilizând chimia alchină-azidă promovată de tulpină (SPAAC)

1.4.3.1 Derivatizarea dibenzilciclooctinei (DBCO)

Anticorpul (MORAb-003 sau MORAb-009, neredus) a fost adus la 10,0 mg/mL în bicarbonat de sodiu 0,1 M, pH 8,3. Propilen glicol la 50% a fost preparat în bicarbonat de sodiu 0,1 M, pH 8,3. NHS-PEG₄-DBCO (Click Chemistry Tools, 50 mM în DMSO) s-a adăugat la propilen glicol la 50% și amestecat profund. Un volum egal de anticorp a fost apoi adăugat la un raport molar de 1:4 (mAb:compus) și amestecat profund. Conjugarea a continuat timp de 1 oră la temperatura camerei. NHS-PEG₄-DBCO care nu a reacționat s-a îndepărtat, așa cum este descris în secțiunea 1.4.4.

1.4.3.2 Conjugare

Propilen glicol la 50% a fost preparat în DPBS. Compuși azido-linker-eribulină s-au adăugat la propilen glicolul la 50% și s-a amestecat profund. La amestec a fost apoi adăugat un volum egal de MORAb-003 sau MORAb-009 modificat DBCO la un raport molar de 1:4 (mAb:compus), și s-a amestecat profund. Conjugarea SPAAC a fost lăsată să se desfășoare pe parcursul nopții la temperatura camerei. NHS-PEG₄-DBCO care nu a reacționat s-a îndepărtat, așa cum este descris în secțiunea 1.4.4.

1.4.4 Purificare

Anticorpul conjugat a fost purificat utilizând coloană (coloane) de desalinizare HiTrap (GE Healthcare). Cromatografia a fost efectuată pe o cromatografie lichidă cu proteină rapidă (FPLC) (GE Healthcare), utilizând IX DPBS ca tampon de rulare, pentru a elimina maleimido/OSu/azido-linker-eribulina și propilen glicolul. Conținutul final de proteine a fost determinat prin analiza BCA, așa cum este descris în secțiunea 1.3.1 din Exemplul 1.

1.5 Caracterizarea biofizică**1.5.1 Analiza SEC-HPLC**

Agregarea ADC-urilor a fost analizată prin cromatografie lichidă de înaltă performanță, cu excluderea dimensiunii (SEC-HPLC), utilizând un HPLC Agilent 1260. ADC a fost diluat la 1 mg/mL în DPBS. ADC (10 μL) a fost injectat apoi pe o coloană de siguranță Advanced SEC 300A (4,6 mm x 3,5 cm, dimensiunea porilor de 2,7 μm, Agilent), urmată de o coloană AdvancedBio 300A (4,6 mm x 30 cm, dimensiunea porilor de 2,7 μm). ADC a fost eluat din coloană cu fosfat de sodiu 0,1 M conținând NaCl 0,15 M și IPA 5%, pH 7,4 la un debit de 0,25 mL/min timp de 28 min. Toate datele au fost analizate utilizând software-ul Agilent ChemStation. Procentul de agregare a fost calculat ca $[PA_{\text{agregat}}/PA_{\text{total}}] \times 100$, unde PA = zona de vârf integrată.

1.5.2 Analiza HIC-HPLC a raportului medicament-anticorp (DAR)

DAR a fost analizat folosind HPLC cu interacțiune hidrofobă (HIC-HPLC). Probele au fost injectate pe TSKgel® Butyl-NP5, 4,6 mm ID x 3,5 cm, coloană de dimensiune neporoasă 2,5 μm (Tosoh Bioscience), și eluate cu o echilibrare de 3 min în 100% din faza mobilă A, un gradient de 15 min (0-100% B), o menținere de 5 min în 100% B, o schimbare de 1 min la 100% A, și o re-echilibrare de 5 min în 100% din faza mobilă A, la 0,7 mL/min. Faza mobilă A a fost fosfat de sodiu 25 mM, sulfat de amoniu 1,5 M, pH 7,0. Faza mobilă B a fost fosfat de sodiu 25 mM, izopropanol 25%, pH 7,0. Detectarea a fost efectuată la 280 nm (referință 320 nm). DAR a fost determinat prin formula:

$$[AUC_{+1} + 2(AUC_{+2}) + 3(AUC_{+3}) + \dots n(AUC_{+n})]/\Sigma AUC_{\text{tot}}$$

în care AUC_{+1} este aria de sub curbă pentru vârful anticorpului corespunzător ADC conjugat cu o citotoxină, AUC_{+2} este aria de sub curbă pentru vârful anticorpului corespunzător ADC conjugat cu două citotoxine, etc. ΣAUC_{tot} este aria de sub curbă combinată pentru toate varfurile.

1.5.3 Analiza LC-MS DAR

DAR a fost analizat, de asemenea, folosind o metodă LC-MS cu un HPLC Alliance Waters cu detectare SQD/PDA. Probele au fost injectate pe o coloană Proteomix RP-1000 (5 μm, 1000A, 4,6 mm x 15 cm, Sepax) la 65°C, și eluate cu o echilibrare de 3 min în 25% B, un gradient liniar de 27 min de la 25% - 55% B, o menținere de 5 min la 55% B, o schimbare de 1 min la 90% B, o menținere de 5 min la 90% B, o schimbare de 1 minut înapoi la 25% B, și o reechilibrare de 5 min la 25% B. Faza mobilă A a fost TFA 0,1% în apă, iar faza mobilă B a fost TFA 0,1% în acetonitril. Eluatul a fost apoi divizat (10:1) în detectoare PDA și SQD. Detectorul SQD a fost configurat ca ES pozitiv, tensiune capilară la 3,2 kV, tensiunea conului la 40 V, extractor la 3 V, și lentilă RF la 0,2 V, temperatură sursei la 150°C, și temperatură de desolvatare la 250°C. Datele de masă au fost achiziționate la 200 - 2000 m/z timp de 40 min, modul continuu, timp de scanare 1 secundă. Datele au fost analizate și supuse deconvoluției offline folosind MassLynx și MaxEnt1. DAR a fost calculat folosind formula:

$$2[[AUC_{LC+1} + 2(AUC_{LC+2}) + 3(AUC_{LC+3}) + \dots n(AUC_{LC+n})]/\Sigma I_{LCtot}] +$$

$$2[[AUC_{HC+1} + 2(AUC_{HC+2}) + 3(AUC_{HC+3}) + \dots n(AUC_{HC+n})]/\Sigma AUC_{Hctot}]$$

în care AUC_{LC+1} este aria de sub curbă a vârfului lanțului ușor conjugat cu o citotoxină, AUC_{LC+2} este aria de sub curbă a vârfului lanțului ușor conjugat cu două citotoxine, etc. AUC_{HC} este aria de sub curbă a lanțurilor

grele corespunzătoare, și $\sum AUC_{LC_{tot}}$ și $\sum AUC_{Hctot}$ sunt aria de sub curbă combinată a tuturor lanțurilor ușoare și lanțurilor grele neconjugate și conjugate, respectiv.

1.5.4 Analiza UPLC/ESI-MS DAR a ADC-urilor LCeys80

ADC (1 mg/mL) a fost redus prin adăugarea de DTT la o concentrație finală de 20 mM, urmată de incubare la 60°C timp de 3 min. Probele au fost apoi analizate folosind o cromatografie lichidă de ultra performanță Waters Acquity și spectrometru de masă Q-ToF Premier. Probele (0,5 - 2 μg fiecare) au fost injectate pe o coloană de micro-desalinizare MassPrep la 65°C, eluate din coloană cu o echilibrare de 5 min în 95% din faza mobilă A, un gradient de 10 min (5-90% B), și o re-echilibrare de 10 min în 95% din faza mobilă A, la 0,05 mL/min. Faza mobilă A a fost acid formic 0,1% în apă. Faza mobilă B a fost acid formic 0,1% în acetonitril. Spectrometrul de masă Q-ToF a fost rulat în modul V, ion pozitiv, cu detectare în intervalul 500-4000 m/z. Parametrii sursei au fost după cum urmează: tensiunea capilară, 2,25 kV (anticorp intact)-2,50 kV (anticorp redus); tensiunea conului de eșantionare, 65,0 V (anticorp intact) sau 50,0 V (anticorp redus); temperatura sursei, 105°C; temperatura de desolvatare, 250°C; debitul gazului de desolvatare, 550 L/oră. Vârful proteinei lanțului ușor a fost supus deconvoluției utilizând funcția MassLynx MaxEnt 1. Intensitățile relative ale maselor lanțului ușor neconjugat și conjugat individual au fost utilizate pentru a calcula DAR-ul general folosind formula:

$$2[LC_{+1}/\sum LC_{tot}]$$

în care LC_{+1} este intensitatea masei lanțului ușor conjugat cu o citotoxină, și $\sum LC_{tot}$ reprezintă intensitățile combinate ale lanțului ușor neconjugat și conjugat.

1.6 Caracterizarea legării

1.6.1 BIAcore

Concentrațiile de anticorpi au fost ajustate la 2 μg/mL în tampon HBS-P+ (GE Healthcare). Anticorpi nemodificați, sau ADC-uri, s-au injectat pe un senzor anti-IgG umană pe un BIAcore T100 (GE Healthcare) timp de 1 min la un debit de 10 μL/min. Pentru a înregistra asocierea antigenului la anticorpul capturat, o serie de concentrații crescătoare de antigen a fost injectată timp de 300 de sec la un debit de 30 μL/min. Pentru anticorpii anti-mezotelină, gama de concentrații a fost de 10 nM - 0,041 nM. Pentru ADC-urile MORAb-003 și MORAb-009, gama de concentrații a fost de 100 nM - 0,41 nM. Disocierea antigenului a fost monitorizată timp de 30 de min. la același debit. Suprafața senzorului a fost regenerată prin injectare de $MgCl_2$ 3 M timp de 2 x 30 sec la un debit de 30 μL/min. Sensogramele au fost analizate cu software-ul de evaluare Biacore T100 utilizând un model de legare Langmuir 1:1.

1.6.2 ELISA - Receptorul alfa al folatului

Receptorul alfa al folatului uman recombinant a fost diluat la 115 ng/mL în tampon de acoperire (tampon carbonat-bicarbonat 50 mM, pH 9,6), și acoperit pe plăci negre cu 96 de godeuri Maxisorp (Thermo, nr. cat. 43711, 100 μL/godeu) la 4°C, pe parcursul nopții. Soluția de acoperire a fost aruncată și plăcile au fost spălate de trei ori folosind IX PBS cu tampon Tween-20 0,05% (PBST). Plăcile au fost blocate în 300 μL de tampon de blocare (BSA 1% în PBST) la temperatura camerei timp de 2 ore pe un agitator orbital. MORAb-003 și ADC-urile MORAb-003 au fost diluate la 1000 ng/mL în tampon de blocare, apoi diluate în serie de 2 ori pentru a obține un interval de la 1000 ng/mL până la 0,98 ng/mL. Tamponul de blocare a fost descărcat și la plăci s-au adăugat 100 μL/godeu de anticorp diluat. Plăcile au fost incubate la temperatura camerei timp de 2 ore pe un agitator orbital. Soluția de anticorp a fost descărcată și plăcile au fost spălate de trei ori folosind PBST. La plăci s-au adăugat 100 μL/godeu de soluție de anti-IgG umană de capră (H+L)-HRP (diluție 1:10.000 în tampon de blocare), și plăcile au fost incubate la temperatura camerei timp de 1 oră pe un agitator orbital. Soluția de anticorp secundar a fost descărcată și plăcile au fost spălate de trei ori folosind PBST. La plăci s-au adăugat 100 μL/godeu de soluție de lucru de substrat fluorogenic de peroxidază QuantaBlu (Thermo, nr. cat. 15169), și plăcile au fost incubate la temperatura camerei timp de 30 de min. Fluorescența a fost citită la excitație 325 nm/emisie 420 nm folosind un SpectraMax M5 (Molecular Devices). Datele au fost analizate folosind software-ul SoftMaxPro 5.4.2 cu montare cu 4 parametri.

1.6.3 ELISA - Mezotelină

Mezotelina umană recombinantă a fost diluată la 1 μg/mL în tampon de acoperire (tampon carbonat-bicarbonat 50 mM, pH 9,6), și acoperită pe plăci negre cu 96 de godeuri Maxisorp (Thermo, nr. cat. 43711, 100 μL/godeu) la 4°C, pe parcursul nopții. Soluția de acoperire a fost descărcată și plăcile au fost spălate de trei ori folosind tampon IX PBS cu Tween-20 0,05% (PBST). Plăcile au fost blocate în 300 μL de tampon de blocare (BSA 1% în PBST) la temperatura camerei timp de 2 ore pe un agitator orbital. MORAb009 și ADC-urile MORAb-009 au fost diluate la 1000 ng/mL în tampon de blocare, apoi diluate în serie de 2,5 ori pentru a

obține un interval de la 1000 ng/mL până la 0,105 ng/mL. Tamponul de blocare a fost descărcat și la plăci s-au adăugat 100 μ L/godeu de anticorp diluat. Plăcile au fost incubate la temperatura camerei timp de 2 ore pe un agitator orbital. Soluția de anticorp a fost descărcată și plăcile au fost spălate de trei ori folosind PBST. La plăci s-au adăugat 100 μ L/godeu de soluție de anti-IgG umană de capră (H+L)-HRP (diluție 1:10.000 în tampon de blocare), și plăcile au fost incubate la temperatura camerei timp de 1 oră pe un agitator orbital. Soluția de anticorp secundar a fost descărcată și plăcile au fost spălate de trei ori folosind PBST. La plăci s-au adăugat 100 μ L/godeu de soluție de lucru de substrat fluorogenic de peroxidază QuantaBlu (Thermo, nr. cat. 15169), și plăcile au fost incubate la temperatura camerei timp de 30 de min. Fluorescența a fost citită la excitație 325 nm/emisie 420 nm folosind un SpectraMax M5 (Molecular Devices). Datele au fost analizate folosind software-ul SoftMaxPro 5.4.2 cu montare cu 4 parametri.

1.7 Analize de citotoxicitate

1.7.1 Analiza cu violet de gențiană

Celule IGROV1 (FR^{hi}, MSLN^{neg}), NCI-H2110 (FR^{med}, MSLN^{med}), și A431 (FR^{neg}, MSLN^{neg}) au fost sub-cultivate și însemănțate la 5.000 de celule/godeu în mediu de creștere complet în plăci de cultură de țesut cu 96 de godeuri, incubate la 37°C, CO₂ 5% pe parcursul nopții (16 ore). Reactivii de test au fost diluați în serie 1:3 în plăci de diluare cu godeuri adânci de 2 mL, începând de la 200 nM (10 diluții în total). Probele diluate (100 μ L) au fost adăugate la plăcile de celule (concentrația inițială a probelor de test la 100 nM). Plăcile au fost incubate la 37°C, CO₂ 5% o perioadă suplimentară de 5 zile. Mediul a fost apoi descărcat. Plăcile au fost spălate o dată cu 200 μ L de DPBS, colorate cu 50 μ L de soluție de violet de gențiană 0,2% la temperatura camerei timp de 15 min, și apoi spălate intens cu apă de la robinet. Plăcile au fost uscate la aer, și violet de gențiană a fost dizolvat cu 200 μ L de soluție SDS 1%. Plăcile au fost citite la 570 nm. Datele au fost analizate folosind GraphPad Prism 6.

2. Rezultate

2.1 Caracterizarea biofizică a ADC-urilor MORAb-003, MORAb-009 și trastuzumab

ADC-uri MORAb-003 (anti-receptorul alfa al folatului uman umanizat), MORAb-009 (anti-mezotelină umană chimeric uman de șoarece), și trastuzumab (anti-her2 uman umanizat) au fost preparați folosind compuși de eribulină care pot fi conjugați enumerați în Tabelul 46 în conformitate cu una dintre cele trei metode de conjugare, incluzând: (1) reducerea parțială a disulfurilor intercatenare de anticorp folosind TCEP non-reductiv de tiol, urmată de conjugare utilizând constructe maleimido-distanțier-linker-eribulină tiol-reactive; (2) conjugarea directă la reziduuri de lizină de anticorp utilizând constructe succinimidă (OSu)-distanțier-linker-eribulină; și (3) conjugarea la reziduuri de lizină de anticorp utilizând o abordare în doi pași, prin care OSu-PEG4-dibenzilciclooctina a fost mai întâi conjugată la reziduuri de lizină, apoi conjugarea ortogonală a constructelor azido-distanțier-linker-eribulină a fost realizată utilizând SPAAC.

După purificare, nivelurile de agregare pentru toți ADC MORAb-003, MORAb-009, și trastuzumab au fost determinate prin SEC-HPLC iar raportul medicament-anticorp (DAR) a fost analizat folosind LC-MS în fază inversă și/sau HIC-HPLC. DAR pentru toți ADC pe bază de maleimidă a fost analizat utilizând atât LC-MS în fază inversă, cât și HIC-HPLC. O diferență în valorile DAR de mai puțin de 0,3 a fost observată de obicei între cele două metode. În schimb, DAR pentru toți ADC preparați prin intermediul conjugării prin reziduuri de lizină a fost analizat numai prin LC-MS, deoarece gradul ridicat de eterogenitate al acestor ADC împiedică rezolvarea speciilor DAR individuale prin HIC-HPLC. Legarea la antigenul țintă a fost analizată, de asemenea, folosind ELISA, pentru ADC MORAb-003 și MORAb-009. Rezultatele analizelor DAR și de agregare sunt arătate în Tabelul 47 lângă ADC respectiv.

Tabelul 47.					Analiza DAR		Analiza SEC-HPLC			Legarea la antigen	
Analize biofizice ale ADC MORAb-003, MORAb-009 și trastuzumab											
ADC-uri	anticorp	chimia de conjugare	distanțier	chimia de scindare	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Agr.	% Monomer	% Frag.	EC ₅₀ , ELISA, ng/mL	ELISA, EC ₅₀ nM
MORAb003		N/A	N/A	N/A			3,62	96,38	0	6,29	0,04
MORAb009		N/A	N/A	N/A			0	100	0	42,60	0,28
trastuzumab		N/A	N/A	N/A			3,52	96,48	0	N/A	N/A
MORAb003-ER1159569 (Lot NB3073-88L)	MORAb-003	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	3,58	3,91	3,12	96,88	0	22,60	0,15
MORAb009-ER1159569 (Lot NB3073-88F)	MORAb-009	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	3,63	3,93	3,23	96,77	0	43,70	0,29
MORAb003-ER1159569 (Lot NB3142-62A)	MORAb-003	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	4,80	4,88	3,21	96,79	0	18,20	0,12
MORAb009-ER1159569 (Lot NB3142-62D)	MORAb-009	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	4,68	4,57	0,90	99,10	0	33,10	0,22
trastuzumab-ER1159569	trastuzumab	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	3,10	3,11	1,26	98,74	0	N/A	N/A
MORAb003-ER1242287	MORAb-003	maleimidă	PEG8	val-cit-pAB	2,31	2,35	18,63	81,37	0	21,50	0,14
MORAb009-ER1242287	MORAb-009	maleimidă	PEG8	val-cit-pAB	1,13	2,00	11,24	88,76	0	58,60	0,39
MORAb003-ER1235638	MORAb-003	maleimidă	pentil	val-cit-pAB	3,65	3,89	3,95	96,05	0	15,30	0,10
MORAb009-ER1235638	MORAb-009	maleimidă	pentil	val-cit-pAB	3,99	4,10	4,5	95,5	0	65,60	0,44
MORAb003-	MORAb-003	maleimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB	3,60	3,83	3,09	96,91	0	18,30	0,12

Tabelul 47.					Analiza DAR		Analiz
Analize biofizice ale ADC MORAb-003, MORAb-009 și trastuzumab							
ADC-uri	anticorp	chimia de conjugare	distanțier	chimia de scindare	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Agr.
ER1231679							
MORAb009-ER1231679	MORAb-009	maleimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB	3,27	3,94	4,39
MORAb003-ER1231690	MORAb-003	maleimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	3,02	3,23	4,44
MORAb009-ER1231690	MORAb-009	maleimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	2,36	3,17	6,22
MORAb003-ER1237504	MORAb-003	maleimidă	PEG4-triazol-PEG3	disulfidil-dimetil-pAB	0,52	1,61	13,73
MORAb009-ER1237504	MORAb-009	maleimidă	PEG4-triazol-PEG3	disulfidil-dimetil-pAB	0,72	1,03	9,78
MORAb003-ER123 7505	MORAb-003	maleimidă	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamidă	1,85	3,88	5,72
MORAb009-ER1237505	MORAb-009	maleimidă	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamidă	2,33	3,91	5,44
MORAb003-PEG2-eribulină	MORAb-003	maleimidă	PEG2	non-scindabilă	4,15	4,49	3,97
MORAb009-PEG2-eribulină	MORAb-009	maleimidă	PEG2	non-scindabilă	4,55	4,30	1,15
MORAb003-PEG4-eribulină	MORAb-003	maleimidă	PEG4	non-scindabilă	4,70	4,79	9,84
MORAb009-PEG4-eribulină	MORAb-009	maleimidă	PEG4	non-scindabilă	4,48	4,57	1,03
MORAb003-ER1236940	MORAb-003	succinimidă	PEG2	val-cit-pAB	0,72		3,65
MORAb009-	MORAb-009	succinimidă	PEG2	val-cit-pAB	0,89		2,75

Tabelul 47.					Analiza DAR		Analiz
Analize biofizice ale ADC MORAb-003, MORAb-009 și trastuzumab							
ADC-uri	anticorp	chimia de conjugare	distanțier	chimia de scindare	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Agr.
ER1236940							
MORAb003-ER1242288	MORAb-003	succinimidă	PEG9	val-cit-pAB	0,00		2,85
MORAb009-ER1242288	MORAb-009	succinimidă	PEG9	val-cit-pAB	0,21		1,69
MORAb003-ER1236941	MORAb-003	succinimidă	pentil	val-cit-pAB	0,77		3,13
MORAb009-ER1236941	MORAb-009	succinimidă	pentil	val-cit-pAB	0,93		3,04
MORAb003-ER1243700	MORAb-003	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	0,00		3,92
MORAb009-ER1243700	MORAb-009	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	0,06		1,97
MORAb003-ER1231691	MORAb-003	succinimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0,37		3,46
MORAb009-ER1231691	MORAb-009	succinimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0,29		2,45
MORAb003-ER1244129	MORAb-003	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	0,24		10,87
MORAb009-ER1244129	MORAb-009	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	0,47		12,79
MORAb003-ER1244623	MORAb-003	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamidă	0,55		5,21
MORAb009-ER1244623	MORAb-009	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamidă	1,14		0
MORAb003-	MORAb-003	succinimidă/	dibenzilciclo-	disilfidil-dimetil-	2,19		4,1

Tabelul 47.					Analiza DAR		Analiz
Analize biofizice ale ADC MORAb-003, MORAb-009 și trastuzumab							
ADC-uri	anticorp	chimia de conjugare	de distanțier	chimia de scindare	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Agr.
DBCO-ER1237508		click	octenă-triazol-PEG3	pAB			
MORAb009-DBCO-ER1237508	MORAb-009	succinimidă/click	dibenzilciclo-octenă-triazol-PEG3	disulfidil-dimetil-pAB	2,33		0
MORAb003-DBCO-ER1138856	MORAb-003	succinimidă/click	dibenzilciclo-octenă-triazol-PEG3	sulfonamidă	1,82		3,49
MORAb009-DBCO-ER1138856	MORAb-009	succinimidă/click	dibenzilciclo-octenă-triazol-PEG3	sulfonamidă	1,59		0
MORAb003-DBCO-PEG4 VCP eribulină	MORAb-003	succinimidă/click	dibenzilciclo-octenă-triazol-PEG4	val-cit-pAB	3,09		2,87
MORAb009-DBCO-PEG4 VCP eribulină	MORAb-009	succinimidă/click	dibenzilciclo-octenă-triazol-PEG4	val-cit-pAB	2,91		0,22
MORAb003-DBCO-PEG2 eribulină	MORAb-003	succinimidă/click	dibenzilciclo-octenă-triazol-PEG2	non-scindabilă	3,43		3,88
MORAb009-DBCO-PEG2 eribulină	MORAb-009	succinimidă/click	dibenzilciclo-octenă-triazol-PEG2	non-scindabilă	3,07		1,15
MORAb003-DBCO-PEG4 eribulină	MORAb-003	succinimidă/click	dibenzilciclo-octenă-triazol-PEG4	non-scindabilă	2,96		3,64
MORAb009-	MORAb-009	succinimidă/click	dibenzilciclo-	non-scindabilă	2,8		1,12

Tabelul 47.					Analiza DAR		Analiză
Analize biofizice ale ADC MORAb-003, MORAb-009 și trastuzumab							
ADC-uri	anticorp	chimia de conjugare	distanțier	chimia de scindare	DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Agr.
DBCO-PEG4 eribulină		click	octenă-triazol-PEG4				

Abrevieri: % Agr., % agregare; % Frag, % fragmentare.

2.1.1 ADC-uri MORAb-003, MORAb-009, și trastuzumab

Nu au fost observate diferențe semnificative între MORAb-003, MORAb-009, și trastuzumab, atât din punctul de vedere al eficienței conjugării, cât și al parametrilor biofizici. Toți ADC au demonstrat valori DAR și niveluri de formare a agregatului similare.

2.1.2 ADC-uri pe bază de maleimidă

Pentru ADC pe bază de maleimidă, ambii distanțieri pentil și PEG₂ imperecheați cu un situs de scindare val-cit-pAB, și un distanțier PEG₂ imperecheat cu un situs de scindare ala-ala-asn-pAB, au furnizat valori DAR cuprinse între 3,5 și 4,0 prin LC-MS în fază inversă și HIC-HPLC, în plus față de nivelurile mici de agregat (< 5%). Cu toate acestea, atunci când distanțierul a fost prelungit la PEG-uri (imperecheat cu un situs de scindare val-cit-pAB), nivelurile de agregat au crescut (11-18%) și eficiența conjugării a scăzut, rezultând valori DAR cuprinse între 1,1 și 2,3. *A se vedea, de exemplu*, procentul de agregare și valorile DAR ale MORAb003/MORAb009-ER-001159569 (linker PEG scurt) și MORAb003/MORAb009-1242287 (linker PEG lung) în Tabelul 47.

Pentru ADC preparați cu un situs de scindare disulfidil-pAB au fost observate valori DAR scăzute (1,0-1,6), împreună cu niveluri de agregat relativ ridicate (10-14%). Au fost observate valori DAR semnificativ mai mici atunci când aceste ADC au fost analizate prin LC-MS decât prin HIC-HPLC (a se vedea, de exemplu, valorile DAR LC-MS/HIC-HPLC pentru MORAb003/MORAb009-ER1237504 și MORAb003/MORAb009-ER1237505 în Tabelul 47). Acest rezultat sugerează că situsul de scindare a linkerului prezintă instabilitate a pH-ului, deoarece faza mobilă a analizei LC-MS este de aproximativ 3,0, în timp ce faza mobilă a analizei HIC-HPLC este neutră.

Pentru ADC preparați cu un situs de scindare sulfonamidă au fost observate niveluri de agregat mici (< 5%). Similar cu ADC-urile disulfidil-pAB, valori DAR mai mici au fost observate atunci când au fost analizate prin LC-MS (1,8 - 2,3) decât prin HIC-HPLC (3,9), ceea ce din nou indică faptul că situsul de scindare a linkerului prezintă instabilitate a pH-ului.

Pentru linkerii non-scindabili PEG₂ și PEG₄ s-a observat o conjugare eficientă, rezultând valori DAR cuprinse între 4,0 și 4,7. ADC-urile MORAb-009 cu acești linkerii non-scindabili au demonstrat, de asemenea, niveluri de agregare scăzute (< 2%), în timp ce nivelurile de agregare ușor mai mari au fost observate pentru ADC-urile MORAb-003 corespunzătoare (4% și 10% pentru PEG₂ și PEG₄, respectiv).

2.1.3 ADC-uri pe bază de succinimidă

Toți ADC preparați folosind succinimidă cuplată cu distanțier-linker-eribulină au avut ca rezultat valori DAR < 1,0. Pentru a confirma că această eficiență de conjugare mai mică (relativ la maleimide) nu a fost o consecință a procedurii de conjugare în sine, acești ADC au fost refăcuți folosind un raport compus:anticorp mai mare și reanalizați folosind aceleași metode de analiză DAR. Au fost obținute rezultate similare, ceea ce sugerează, fără a fi legat de teorie, că valorile DAR mai mici sunt o proprietate inerentă a combinației de succinimidă și eribulină, și că maleimidele pot fi conjugate mai eficient. Eficiența conjugării cu succinimidă a fost crescută prin utilizarea unei metode în două etape, prin care DBCO a fost adăugată mai întâi la anticorp utilizând NHS-DBCO, după care a urmat adăugarea compușilor azido. Această abordare are ca rezultat valori DAR mai mari, așa cum sunt măsurate prin analiza HPLC cu fază inversă, în comparație cu conjugarea în mod direct la reziduurile de lizină de anticorp. Pentru ADC-urile pe bază de succinimidă având linkerii sulfonamidă (scindabil), val-cit-PAB (scindabil) sau PEG₂/PEG₄ (non-scindabil), valorile DAR rezultate din conjugarea în două etape au fost similare cu cele determinate pentru ADC-urile pe bază de maleimidă având un situs de scindare de sulfonamidă. Fără a fi legat de teorie, acest rezultat sugerează din nou că valori DAR mai mici pentru reacțiile de conjugare succinimidă-distanțier-linker-eribulină sunt o proprietate inerentă a combinației de succinimidă și eribulină.

2.2 Caracterizarea legării a ADC-urilor MORAb-003 și MORAb-009

Pentru ADC-urile MORAb-003 nu au fost observate diferențe semnificative între ADC-urile linker-eribulină pe bază de maleimidă care nu pot fi scindate și MORAb-003 parental în ceea ce privește legarea la antigenul țintă. Pentru alte ADC-uri MORAb-003 linker-eribulină pe bază de maleimidă, prin analiza ELISA a fost observată de obicei o pierdere de 2 până la 3 ori în legarea la antigenul țintă în raport cu MORAb-003 parental. Cu toate acestea, nu a existat nicio corelație aparentă fie între lungimea linkerului, fie între compoziția linkerului, și valori EC₅₀ mai mici. În mod similar, pentru ADC-urile MORAb-003 linker-eribulină pe bază de succinimidă a fost observată în general o pierdere de 0 până la 3 ori în legarea la antigenul țintă în raport cu MORAb-003 neconjugat. Din nou, nu a fost evidentă nicio corelație fie între lungimea linkerului, fie între compoziția linkerului, și valori EC₅₀ mai mici. Pentru ADC MORAb-009, toți ADC au avut o scădere de mai puțin de 2 ori a valorilor EC₅₀, în raport cu MORAb-009 parental.

2.3 Analizele de citotoxicitate *in vitro* ale ADC-urilor MORAb-003, MORAb-009, și trastuzumab

Potența *in vitro* a ADC MORAb-003, MORAb-009, și trastuzumab preparați a fost evaluată utilizând o analiză de citotoxicitate pe bază de celule cu violet de gențiană. Liniile de celule selectate pentru screening-ul ADC MORAb-003 și MORAb-009 au fost IGROV1, NCI-H2110, și A431. Celulele IGROV1 au ca origine carcinom epitelial ovarian uman și exprimă niveluri ridicate ale receptorului alfa al folatului, dar nu exprimă mezotelină (adică, MORAb-003-reactiv). Celulele NCI-H2110 au ca origine carcinom pulmonar cu celule non-mici uman și exprimă niveluri moderate atât ale receptorului alfa al folatului cât și ale mezotelinei (adică, MORAb-003- și MORAb-009-reactive). Celulele de control A431 au ca origine carcinom epidermic uman și nu exprimă niciun antigen țintă. Rezultatele acestui screening sunt arătate în Tabelul 48. ADC MORAb-003, MORAb-009, și trastuzumab care cuprind linker-toxina maleimido-PEG2-val-cit-pAB-eribulină (VCP-eribulină) au fost, de asemenea, evaluați în linii de celule de cancer gastric și de sân suplimentare, inclusiv NCI-N87 (FR^{lo}, MSLN^{med}, her2^{hi}), BT-474 (FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{hi}), ZR-75 (FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{med}), și NUGC3 (FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{neg}). Rezultatele acestui screening sunt arătate în Tabelul 49.

Tabelul 48. Screening-ul de citotoxicitate (IC ₅₀) al ADC MORAb-003 și MORAb-009 pe celule IGROV1, NCI-H2110, și A431					Analiza citotoxicității					
					IGROV1 (FR ^{hi} , MSLN ^{neg})		NCI-H2110 (FR ^{med} , MSLN ^{med})		A431 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg})	
ADC	anticorp	chimia de conjugare	de distanțier	chimia de scindare	IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)	SD
MORAb003		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MORAb009		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
trastuzumab		N/A	N/A	N/A						
eribulină	N/A	N/A	N/A	N/A	0,320	0,212	0,199	0,034	0,653	0,159
MORAb003-ER1159569 NB3073-88L)	(Lot MORAb-003	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	0,155	0,064	3,685	0,417	> 100	
MORAb009-ER1159569 NB3073-88F)	(Lot MORAb-009	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	9,450	2,093	14,945	1,747	> 100	
MORAb003-ER1159569 NB3142-62A)	(Lot MORAb-003	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	0,020		1,550		> 100	
MORAb009-ER1159569 NB3142-62D)	(Lot MORAb-009	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	5,687		6,784		> 100	
trastuzumab-ER1159569	trastuzumab	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB						
MORAb003-ER1242287	MORAb-003	maleimidă	PEG8	val-cit-pAB	0,115	0,035	7,065	0,417	85,960	
MORAb009-ER1242287	MORAb-009	maleimidă	PEG8	val-cit-pAB	25,765	8,478	34,455	3,033	> 100	
MORAb003-ER1235638	MORAb-003	maleimidă	pentil	val-cit-pAB	0,105	0,092	3,920	1,032	> 100	
MORAb009-ER1235638	MORAb-009	maleimidă	pentil	val-cit-pAB	6,830	0,962	13,965	6,611	> 100	
MORAb003-ER1231679	MORAb-003	maleimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0,080	0,028	3,800	0,566	31,630	1,202

Tabelul 48. Screening-ul de citotoxicitate (IC ₅₀) al ADC MORAb-003 și MORAb-009 pe celule IGROV1, NCI-H2110, și A431					Analiza citotoxicității		
					IGROV1 (FR ^{hi} , MSLN ^{neg})	NCI-H2110	A431
ADC	anticorp	chimia de conjugare	distanțier	chimia de scindare	IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)
MORAb009-ER1231679	MORAb-009	maleimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB	8,890	0,976	7,0
MORAb003-ER1231690	MORAb-003	maleimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	0,125	0,021	4,7
MORAb009-ER1231690	MORAb-009	maleimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	16,980	5,176	12,0
MORAb003-ER1237504	MORAb-003	maleimidă	PEG4-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	0,265	0,092	0,8
MORAb009-ER1237504	MORAb-009	maleimidă	PEG4-triazol-PEG3	disilfidil-dimetil-pAB	6,375	2,751	1,2
MORAb003-ER1237505	MORAb-003	maleimidă	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamidă	0,370	0,269	0,6
MORAb009-ER1237505	MORAb-009	maleimidă	PEG4-triazol-PEG3	sulfonamidă	6,370	3,012	0,9
MORAb003-PEG2-eribulină	MORAb-003	maleimidă	PEG2	non-scindabilă	0,330		38
MORAb009-PEG2-eribulină	MORAb-009	maleimidă	PEG2	non-scindabilă	42,770		50
MORAb003-PEG4-eribulină	MORAb-003	maleimidă	PEG4	non-scindabilă	0,277		21
MORAb009-PEG4-eribulină	MORAb-009	maleimidă	PEG4	non-scindabilă	76,320		31
MORAb003-ER1236940	MORAb-003	succinimidă	PEG2	val-cit-pAB	0,325	0,106	30
MORAb009-ER1236940	MORAb-009	succinimidă	PEG2	val-cit-pAB	31,915	2,510	36
MORAb003-ER1242288	MORAb-003	succinimidă	PEG9	val-cit-pAB	38,105	45,601	64

Tabelul 48. Screening-ul de citotoxicitate (IC ₅₀) al ADC MORAb-003 și MORAb-009 pe celule IGROV1, NCI-H2110, și A431					Analiza citotoxicității		
					IGROV1 (FR ^{hi} , MSLN ^{neg})	NCI-H2110	A431
ADC	anticorp	chimia de conjugare	distanțier	chimia de scindare	IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)
MORAb009-ER1242288	MORAb-009	succinimidă	PEG9	val-cit-pAB	> 100		> 100
MORAb003-ER1236941	MORAb-003	succinimidă	pentil	val-cit-pAB	0,330	0,071	42
MORAb009-ER1236941	MORAb-009	succinimidă	pentil	val-cit-pAB	> 100		49
MORAb003-ER1243700	MORAb-003	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	1,150		> 100
MORAb009-ER1243700	MORAb-009	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	val-cit-pAB	> 100		> 100
MORAb003-ER1231691	MORAb-003	succinimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB	12,320		31
MORAb009-ER1231691	MORAb-009	succinimidă	PEG2	ala-ala-asn-pAB	> 100		20
MORAb003-ER1244129	MORAb-003	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	disulfidil-dimetil-pAB	0,370	0,184	0,7
MORAb009-ER1244129	MORAb-009	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	disulfidil-dimetil-pAB	6,595	4,052	0,8
MORAb003-ER1244623	MORAb-003	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamidă	0,980	0,396	1,8
MORAb009-ER1244623	MORAb-009	succinimidă	PEG3-triazol-PEG3	sulfonamidă	24,505	4,702	2,2
MORAb003-DBCO-ER1237508	MORAb-003	succinimidă/click	dibenzilciclooctenă-triazol-PEG3	disulfidil-dimetil-pAB	0,545	0,389	0,9
MORAb009-DBCO-ER1237508	MORAb-009	succinimidă/click	dibenzilciclooctenă-triazol-PEG3	disulfidil-dimetil-pAB	10,245	3,486	1,0
MORAb003-DBCO-ER1138856	MORAb-003	succinimidă/click	dibenzilciclooctenă-triazol-PEG3	sulfonamidă	1,775	1,421	1,6

Tabelul 48. Screening-ul de citotoxicitate (IC ₅₀) al ADC MORAb-003 și MORAb-009 pe celule IGROV1, NCI-H2110, și A431					Analiza citotoxicității		
					IGROV1 (FR ^{hi} , MSLN ^{neg})	NCI-H2110	A431
ADC	anticorp	chimia de conjugare	distanțier	chimia de scindare	IC ₅₀ (nM)	SD	IC ₅₀ (nM)
MORAb009-DBCO-ER1138856	MORAb-009	succinimidă/click	dibenzilciclooctenă-triazol-PEG3	sulfonamidă	19,155	5,438	1,900
MORAb003-DBCO-PEG4 VCP eribulină	MORAb-003	succinimidă/click	dibenzilciclooctenă-triazol-PEG4	val-cit-pAB	0,038		4,200
MORAb009-DBCO-PEG4 VCP eribulină	MORAb-009	succinimidă/click	dibenzilciclooctenă-triazol-PEG4	val-cit-pAB	12,960		31,000
MORAb003-DBCO-PEG2 eribulină	MORAb-003	succinimidă/click	dibenzilciclooctenă-triazol-PEG2	non-scindabilă	4,250		38,000
MORAb009-DBCO-PEG2 eribulină	MORAb-009	succinimidă/click	dibenzilciclooctenă-triazol-PEG2	non-scindabilă	75,680		85,000
MORAb003-DBCO-PEG4 eribulină	MORAb-003	succinimidă/click	dibenzilciclooctenă-triazol-PEG4	non-scindabilă	1,323		46,000
MORAb009-DBCO-PEG4 eribulină	MORAb-009	succinimidă/click	dibenzilciclooctenă-triazol-PEG4	non-scindabilă	61,490		39,000

Toate valorile IC₅₀ sunt în nM, și reprezintă valorile medii ale experimentelor în replicat. SD - deviație standard.

Tabelul 49. Screening-ul de citotoxicitate (IC ₅₀) al ADC MORAb-003, MORAb-009, și trastuzumab pe celule NCI-N87, BT-474, ZR-75, și NUGC3					Analiza citotoxicității	
					NCI-N87-Luc (FR ^{lo} , MSLN ^{med} , her2 ^{hi})	BT-474 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg} , her2 ^{hi})
ADC	anticorp	chimia de conjugare	distanțier	chimia de scindare	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
MORAb003		N/A	N/A	N/A		
MORAb009		N/A	N/A	N/A		
trastuzumab		N/A	N/A	N/A	0,78	0,641
eribulină	N/A	N/A	N/A	N/A	0,257	0,151
MORAb003-ER1159569 (Lot NB3073-88L)	MORAb-003	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB		
MORAb009-ER1159569 (Lot NB3073-88F)	MORAb-009	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB		
MORAb003-ER1159569 (Lot NB3142-62A)	MORAb-003	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	4,528	11,46
MORAb009-ER1159569 (Lot NB3142-62D)	MORAb-009	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	0,013	10,21
trastuzumab-ER1159569	trastuzumab	maleimidă	PEG2	val-cit-pAB	0,006	0,003

Toate valorile IC₅₀ sunt în nM, și reprezintă valorile medii ale experimentelor în replicat. SD - deviație standard.

2.1.1

2.3.1 Citotoxicitatea ADC pe bază de maleimidă

Toți ADC MORAb-003 și MORAb-009 pe bază de maleimidă au afișat citotoxicitate specifică pe celulele IGROV1, cu o diferență de 2-3 ordine de mărime în potență observată între anticorpi. ADC MORAb-003 val-cit-pAB-eribulină au demonstrat o potență mai mare pe linia de celule IGROV1 decât oricare dintre ADC MORAb-003 PEG₂ sau PEG₄ non-scindabile, dar specificitatea de pliere nu a fost modificată. Tendințe similare au fost observate pentru ADC-urile MORAb-009, cu ADC-urile MORAb-009 care nu pot fi scindate demonstrând citotoxicitate mai mică pe celulele IGROV1 decât ADC-urile MORAb-009 val-cit-pAB-eribulină.

ADC-urile MORAb-009 pe bază de maleimidă cu linker pe bază de disulfidil și sulfonamidă au demonstrat o potență mai mare pe linia de celule NCI-H2110 decât pe linia de celule IGROV1. Acest lucru se poate datora instabilității potențiale a linkerilor în cultură, așa cum este descris mai jos. Citotoxicitatea puternică a fost observată, de asemenea, cu ADC-urile MORAb-003 corespunzătoare. În schimb, ADC-urile MORAb-003 și MORAb-009 pe bază de maleimidă cu linker non-scindabili au demonstrat o potență relativ mică pe celulele NCI-H2110. Fără a fi legat de teorie, acest rezultat sugerează că, cu o exprimare a țintei mai mică, scindarea eficientă și eliberarea sarcinii utile pot îmbunătăți citotoxicitatea.

ADC-urile cu un linker care poate fi scindat cu enzimă val-cit-pAB sau un linker care nu poate fi scindat au demonstrat niveluri scăzute de ucidere departe de țintă pe celulele de control A431 ($IC_{50} > 100$ nM), în timp ce ADC-urile cu un linker care poate fi scindat cu enzimă ala-ala-asn-pAB au afișat uciderea slabă, dar detectabilă, a acestor celule de control. Acest lucru indică faptul că linkerii care pot fi scindați cu enzimă val-cit-pAB pot fi mai stabili în cultură decât linkerii care pot fi scindați cu enzimă ala-ala-asn-pAB. În plus, ADC MORAb-009 cu un distanțier PEG₂ mai scurt au demonstrat citotoxicitate mai mare în celulele IGROV1 decât ADC corespunzătorii cu un distanțier PEG₈ mai lung. Aceeași tendință a fost observată în celulele NCI-H2110 atât pentru ADC-urile MORAb-003, cât și MORAb-009, cu lungimi ale distanțierului mai scurte având ca rezultat citotoxicitate mai mare.

ADC cu linker pe bază de sulfonamidă au demonstrat, în general, valori DAR mai mari și niveluri de agregat mai mici decât ADC corespunzătorii cu linker pe bază de disulfidil. Cu toate acestea, uciderea la nivel de nM a celulelor de control A431 a fost observată în amândouă aceste categorii de ADC, sugerând că linkerii pe bază de disulfidil și sulfonamidă au fost mai puțin stabili în cultură decât linkerii care pot fi scindați de enzimă în condițiile de analiză examinate.

Linker-toxina specifică maleimido-PEG₂-val-cit-pAB-eribulină (VCP-eribulină) s-a examinat în continuare pentru specificitate și potență pe diferite linii de celule de cancer gastric și de sân. VCP-eribulina a fost conjugată la MORAb-003 și MORAb-009, în plus față de anticorpii anti-her2 uman trastuzumab. MORAb-003-VCP-eribulina a demonstrat ucidere slabă, dar specifică, pe celulele NCI-N87, care exprimă niveluri scăzute de receptor alfa al folatului (FR), și ucidere mică pe cele trei linii celulare FR-negative rămase. MORAb-009-VCP-eribulina a demonstrat, de asemenea, citotoxicitate puternică pe celulele NCI-N87, care exprimă niveluri moderate de mezotelină. Trastuzumab-VCP-eribulina a fost foarte puternică (3 - 6 pM, IC_{50}) pe celulele NCI-N87 și BT-474, cele două linii de celule care exprimă niveluri ridicate de her2 și, de asemenea, puternică pe celulele de cancer de sân ZR-75, care exprimă doar moderat her2. ADC MORAb-003, MORAb-009 și trastuzumab VCP-eribulină au demonstrat, toți, citotoxicitate scăzută pe celulele NUGC3, care nu exprimă FR, mezotelină, sau her2, respectivii antigeni țintă.

2.3.2 Citotoxicitatea ADC pe bază de succinimidă

Tendințele citotoxicității ADC pe bază de succinimidă au fost similare cu cele ale ADC pe bază de maleimidă pentru celulele IGROV1, cu ADC cu distanțier PEG₈ demonstrând citotoxicitate scăzută în plus față de valorile DAR scăzute. Citotoxicitate mai scăzută atât pe celulele IGROV1, cât și pe celulele NCI-H2110 a fost observată în general pentru ADC pe bază de succinimidă cu linker care pot fi scindați cu enzimă în comparație cu ADC pe bază de maleimidă corespunzătorii, ceea ce s-a datorat cel mai probabil valorilor lor DAR mai mici. Uciderea departe de țintă a celulelor A431 a fost observată, de asemenea, cu linker pe bază de disulfidil și sulfonamidă, similar cu ADC pe bază de maleimidă corespunzătorii. Acest lucru indică o instabilitate crescută care ar putea să apară în mod potențial din locul de clivaj, mai degrabă decât din chimia conjugării.

Atunci când a fost efectuată o conjugare în două etape, au fost observate valori DAR mai mari în raport cu cele obținute cu abordarea cu conjugare directă cu succinimidă. Aceste valori DAR mai mari s-au corelat cu o potență mai mare. Pentru ADC MORAb-003 VCP-eribulină a fost observată citotoxicitate puternică atât pe celulele IGROV1, cât și pe celulele NCI-H2110. În timp ce ADC-urile MORAb-003 non-scindabili au demonstrat potență pe celulele IGROV1 (1 - 4 nM), aceștia erau încă mai puțin potenți decât

ADC MORAb-003 VCP-eribulină preparat cu această metodă (38 pM), chiar dacă valorile DAR au fost comparabile. În plus, ADC-urile MORAb-003 non-scindabile care s-au preparat utilizând metoda în două etape au fost ușor mai puțin potenți decât ADC pe bază de maleimidă corespunzători pe linia de celule IGROV1, ceea ce se poate datora valorilor lor DAR mai mici. Similar cu omologii lor pe bază de maleimidă, ADC non-scindabili preparați folosind metoda în două etape au pierdut, de asemenea, aproape toată citotoxicitatea pe celulele NCI-2110.

2.4 Caracterizarea biofizică a ADC-urilor anti-mezotelină umană (LCcys80)

MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-eribulină (ER-001159569) s-a conjugat la opt anticorpi diferiți anti-mezotelină umană (Tabelul 1). Afinitățile de legare ale anticorpilor parentali au fost determinate prin analiza BIAcore, așa cum este descris mai sus în secțiunea 1.6.1. Nivelurile de agregare pentru toți ADC anti-mezotelină umană au fost determinate prin SEC-HPLC și DAR a fost analizat utilizând HIC-HPLC. Potența *in vitro* a fost evaluată utilizând o analiză de citotoxicitate pe bază de celule cu violet de gențiană în celule A3 (A431 transfectate în mod stabil cu mezotelină umană (MSLN), MSLN^{hi}), OVCAR3 (ovarian uman, MSLN^{hi}), HEC-251 (endometroid uman, MSLN^{med}), H226 (mezoteliom pulmonar uman cu celule scuamoase, MSLN^{lo}), și A431 parental (MSLN^{neg}). Rezultatele analizelor DAR, de agregare și de citotoxicitate sunt arătate în Tabelul 50.

Tabelul 50. Caracterizarea biofizică a ADC-urilor anti-mezotelină umană (LCcys80)

		MAb parental			ADC								
		Afinitate			Sarcină utilă	HIC	SEC-HPLC		Analiza de citotoxicitate pe bază de celule. EC50, nM				
		k_a ($10^3 M^{-1} sec^{-1}$)	k_d ($10^{-3} sec^{-1}$)	K_D ($10^{-9} M$)	Medicament-linker	DAR	% agregat %	mono- mer	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3
33011	xi				ER-001159569-000	1,92	8,97	91,03	40,67	0,008	3,950	> 100	0,14
	zu	2,2	0,65	3,4	ER-001159569-000	1,69	1,42	98,58	-100	0,064	26,500	> 100	0,28
111BI 0	xi	6,5	3,9	6,3	ER-001159569-000	1,90	4,25	95,75	38,10	0,004	13,960	-100	0,05
	zu	5,1	3	6,5	ER-001159569-000	1,81	3,64	96,36	68,92	0,014	27,42	> 100	0,12
201C1 5	xi	2,4	0,26	1,1	ER-001159569-000	1,85	1,62	98,38	48,50	0,004	14,82	-100	0,27
	zu	3,1	1,1	4,2	ER-001159569-000	1,80	5,84	94,16	68,88	0,290	20,42	> 100	0,41
346C6	xi	3,8	0,49	1,4	ER-001159569-000	1,56	5,28	94,72	34,49	0,087	5,73	-100	0,11
	zu	133	93	8,9	ER-00115969-000	1,63	4,48	95,52	72,86	1,180	32,54	> 100	0,55

Abrevieri: xi - chimeric; zu - umanizat.

Toți ADC anti-mezotelină umană au păstrat niveluri de agregare scăzute (< 10% agregat) și au demonstrat o potență ridicată pe liniile de celule țintă. Pe A3 și OVCAR3 a fost observată potență ridicată, în timp ce celulele HEC-251 și H226 au fost relativ rezistente la citotoxicitatea ADC.

5

Secvențe selectate:

ID. SECV. NR.: 1 (Lanț greu (HC) MORAb-003)

```

1    EVQLVESGGG VVQPGRSRLRL SCSASGFTFS GYGLSWVRQA PGKGLEWVAM
51   ISSGGSYTTY ADSVKGRFAI SRDNAKNTLF LQMDSLRPED TGVYFCARHG
101  DDPWFAYWG QGTPVTVSSA STKGPSVEPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151  YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGTQTY
201  ICNVNHNKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
251  DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301  TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351  YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
10  401  DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

ID. SECV. NR.: 2 (CDR1 HC MORAb-003; Kabat): GYGLS

ID. SECV. NR.: 3 (CDR2 HC MORAb-003; Kabat): MISSGGSYTTYADSVKG

ID. SECV. NR.: 4 (CDR3 HC MORAb-003; Kabat): HGDDPAWFAY

15 ID. SECV. NR.: 5 (Secvență de aminoacizi pre-proteică de lungime completă a lanțului greu MORAb-003; secvența lider subliniată)

```

1    MGWSCIIILFL VATATGVHSE VQLVESGGGV VQPGRSRLRLS CSASGFTFSG
51   YGLSWVRQAP GKGLEWVAMI SSGGSYTYA DSVKGRFAIS RDNAKNTLFL
101  QMDSLRPEDT GYVFCARHGD DPAWFAYWGQ GTPVTVSSAS TKGPSVFPLA
151  PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201  YLSLVSVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC
251  PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH EDPVKFNWYV
301  DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
351  APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
401  EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
451  EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

20 ID. SECV. NR.: 6 (Lanț ușor (LC) MORAb-003)

```

1    DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSVSSSIS SNNLHWYQQK PGKAPKPIY
51   GTSNLAGSVP SRFSGSGSGT DYTFTISSLQ PEDIATYYCQ QWSSYPYMYT
101  FGQGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ
151  WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT
201  HQGLSSPVTK SFNRGEC

```

ID. SECV. NR.: 7 (CDR1 LC MORAb-003; Kabat): SVSSSISSNNLH

25 ID. SECV. NR.: 8 (CDR2 LC MORAb-003; Kabat): GTSNLAGS

ID. SECV. NR.: 9 (CDR3 LC MORAb-003; Kabat): QQWSSYPYMYT

ID. SECV. NR.: 10 Secvență de aminoacizi pre-proteică de lungime completă a lanțului ușor MORAb-003 (secvența lider subliniată)

```

1    MGWSCIIILFL VATATGVHSD IQLTQSPSSL SASVGDRVTI TCSVSSSIS
51   NNLHWYQQK GKAPKPIY GTSNLAGSVP SRFSGSGSGTD YFTISSLQ
101  EDIATYYCQQ WSSYPYMYTF GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
30  151  TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
201  LTLKADYE KHKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

ID. SECV. NR.: 11 (nt HC MORAb-003)

```

1   ATGGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
51  CCCTCCCGAG GTCCAACTGG TGGAGAGCGG TGGAGGTGTT GTGCAACCTG
101 GCCGGTCCCT GCGCCTGTCC TGCTCCGCAT CTGGCTTCAC CTTCAGCGGC
151 TATGGGTGTG CTTGGGTGAG ACAGGCACCT GGAAAAGGTC TTGAGTGGGT
201 TGCATGATT AGTAGTGGTG GTAGTTATAC CTACTATGCA GACAGTGTGA
251 AGGGTAGATT TGCAATATCG CGAGACAACG CCAAGAACAC ATTGTTCTCTG
301 CAAATGGACA GCCTGAGACC CGAAGACACC GGGGTCTATT TTTGTGCAAG
351 ACATGGGGAC GATCCCGCCT GGTTCGCTTA TTGGGGCCAA GGGACCCCGG
401 TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA
451 CCCTCCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT
501 CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC
551 TGACCAGCGG CGTGCACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAGCT TGGGCACCCA
651 GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
701 AGAAAGTTGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
751 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCTAA
801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
851 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTAGGTG
901 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
951 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTTG CACCAGGACT
1001 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
1051 GCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCGGAGAAC
1101 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG
1151 TCAGCCTGAC CTGCTGTGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCGGTG
1201 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCTCTC
1251 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT ATATTCAAAG CTCACCGTGG
1301 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAAAGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1351 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCCGG
1401 GAAATGA

```

ID. SECV. NR.: 12 (nt LC MORAb-003)

```

1   ATGGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
51  CCCTCCCGAC ATCCAGCTGA CCCAGAGCCC AAGCAGCCTG AGCGCCAGCG
101 TGGGTGACAG AGTGACCATC ACCTGTAGTG TCAGCTCAAG TATAAGTTCC
151 AACAACTTGC ACTGGTACCA GCAGAAGCCA GGTAAAGGCTC CAAAGCCATG
201 GATCTACGGC ACATCCAACC TGGCTTCTGG TGTGCCAAGC AGATTGACGG
251 GTAGCGGTAG CGGTACCGAC TACACCTTCA CCATCAGCAG CCTCCAGCCA
301 GAGGACATCG CCACCTACTA CTGCCAACAG TGGAGTAGTT ACCCGTACAT
351 GTACACGTTT GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG
401 CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
451 ACTGCCCTTG TTGTGTGCCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
551 GTGTACAGAG GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
5   701 GAGAGTGTTA A

```

ID. SECV. NR.: 13 (CDR1 HC MORAb-003; IMGT): GFTFSGYG

ID. SECV. NR.: 14 (CDR2 HC MORAb-003; IMGT): ISSGGSYT

ID. SECV. NR.: 15 (CDR3 HC MORAb-003; IMGT): ARHGDDPAWFAY

10 ID. SECV. NR.: 16 (CDR1 LC MORAb-003; IMGT): SSISSNN

ID. SECV. NR.: 17 (CDR2 LC MORAb-003; IMGT): GTS

ID. SECV. NR.: 18 (CDR3 LC MORAb-003; IMGT): QQWSSYPYMYT

ID. SECV. NR.: 19 (FRA uman)

```

1   maqrmttqll lllvwvavvg eaqtriawar tellnvcma khkhkekpge dklheqcrpw
61  rknaccstnt squeahkdvsy lyrfnwnhcg emapackrhf iqdtclyec pnlgpwiqqv
121 dgsrwrkervl nvplckedce qwwedcrtsy tcksnwhkgw nwtsgfnkca vgaacqpfhf
181 yfptptvlen eiwthsykvs nysrgsgrei qmwfdpaqgn pneevarfya aamsagapwa
15  241 awpflslslal mllwlls

```

ID. SECV. NR.: 20 (nucleotidă de FRA uman)

1 cattcccttgg tgcactgac cacagctctt tcttcaggga cagacatggc tcagcggatg
 61 acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg
 121 attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa
 181 aagccaggcc ccaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc
 241 tgttctacca acaccagcca ggaageccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac
 301 tggaaccaact gtggagagat ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc
 361 ctctacgagt gctccccc aa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc
 421 aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat
 481 tgtcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg
 541 ttttaacaagt ggcagtgagg agctgcctgc caacctttcc atttctactt cccacacccc
 601 actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tctacaagg tcagcaacta cagccgaggg
 661 agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg
 721 gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggccc ggcagcctg gcttttctg
 781 cttagcctgg cctaatgct gctgtggctg ctacagctgac ctctttttac cttctgatac
 841 ctggaaatcc ctgcctgtt cagcccaca gctcccaact atttggttcc tgcctcatgg
 901 tcgggctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat
 961 ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa

ID. SECV. NR.: 21 (her2 uman)

1 melaalcrwg lllallppga astqvctgtd mklrlpaspe thldmlrhly qgcqvvggnl
 61 eltylptnas lsflqdiqev qgyvliahnq vrqvpqlrlr ivrgtqlfed nyalavldng
 121 dplnnttpvt gaspgglrel qlrslteilk ggvligrnpq lcyqdtlwk difhknngla
 181 ltlidtnrsr achpcspmk gsrowgesse dcqsltrtvc aggcacckgp lptdccheqc
 241 aagctgpkhs dclaclhfnh sgicelhcpa lvtyntdtfe smpnpegryt fgascvtacp
 301 ynylstdvgs ctlvcpnlhq evtaedgtqr cekckpcar vcyglgmehl revravtsan
 361 iqefagckki fgslaflpes fdgdpasnta plqpeqlqv etleeitgyl yisawpdsip
 421 dlsvfqnlqv irgrilhnga ysltlqglgi swlglrslre lgsglalihh nthlcfvhtv
 481 pwdqlfrnph qallhtanrp edecvgegla chqlcarghc wpgpqtqcvn csqflrgqec
 541 veecrvlqgl preyvnrhc lpchpecqpg ngsvtcfgpe adqcvacahy kdpfpfvarc
 601 psgvkdpsly mpiwkfpdee gacqpcpinc thscvdlldk gcpaeqrasp ltsiisavvg
 5 661 illvvvlqvv fgilikkrrq kirkytmrri lqetelvepl tpsgampnqa qmrilketel
 721 rkvvklsga fgtvykigiwi pdgenvkipv aikvlrents pkankeilde ayvmagvgsp
 781 yvsrllgicl tstvqlvtql mpygcldhv renrglgsq dllnwcmqia kgmsyledvr
 841 lvhrdlaarn vlvkspnhvk itdfglarl dideteyhad ggkvpikwma lesilrrrft
 901 hqsdvwsygv tvwelmtfga kpydgipare ipdllekger lpqppictid vymimvkcwm
 961 idsecrprfr elvsefsrma rdpqrfvviq nedlqpaspl dstfyrslle dddmgdlvda
 1021 eeylvpqggf fcpdpapgag gmvhhrhrss strsgggdlt lglepseee prsplapseg
 1081 agsdvfdgdl gmgaakglqs lpthdpsplq ryseidptvpl psetdgyvap ltcspqpeyv
 1141 nqpdvrpqp spreglpaa rpagatlerp ktlspgkngv vkdvfaffga venpeyltpq
 1201 ggaapqphp pafspafdnl yywdqddper gapstfkgt ptaenpeylg ldvpv

ID. SECV. NR.: 22 (nucleotidă de her2 uman)

```

1      ATGGAGCTGG CGGCCTTGTG CCGCTGGGGG CTCCTCCTCG CCCTCTTGCC CCCC GGAGCC
61     GCGAGCACCC AAGTGTGCAC CGGCACAGAC ATGAAGCTGC GGCTCCCTGC CAGTCCCAG
121    ACCCACCTGG ACATGCTCCG CCACCTCTAC CAGGGCTGCC AGGTGGTGCA GGGAAACCTG
181    GAACTCACCT ACCTGCCCAC CAATGCCAGC CTGTCTTCC TGCAGGATAT CCAGGAGGTG
241    CAGGGCTACG TGCTCATCGC TCACAACCAA GTGAGGCAGG TCCCCTGCA GAGGCTGCGG
301    ATTGTGCGAG GCACCCAGCT CTTTGAGGAC AACTATGCCC TGGCCGTGCT AGACAATGGA
361    GACCCGCTGA ACAATACCAC CCCTGTCACA GGGGCCTCCC CAGGAGGCCT GCGGGAGCTG
421    CAGCTTCGAA GCCTCACAGA GATCTTGAAA GGAGGGGTCT TGATCCAGCG GAACCCCCAG
481    CTCTGCTACC AGGACACGAT TTTGTGGAAG GACATCTTCC ACAAGAACAA CCAGCTGGCT
541    CTCACACTGA TAGACACCAA CCGCTCTCGG GCCTGCCACC CCTGTTCTCC GATGTGTAAG
601    GGCTCCCGCT GCTGGGGAGA GAGTTCTGAG GATTGTCAGA GCCTGACGCG CACTGTCTGT
661    GCCGGTGGCT GTGCCCCGCT CAAGGGGCCA CTGCCCACTG ACTGCTGCCA TGAGCAGTGT
721    GCTGCCGGCT GCACGGGCCC CAAGCACTCT GACTGCCTGG CCTGCCTCCA CTTCAACCAC
781    AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCCAGCC CTGGTCACCT ACAACACAGA CACGTTTGAG
841    TCCATGCCCC ATCCCAGAGG CCGGTATACA TTCGGCGCCA GCTGTGTGAC TGCCTGTCCC
901    TACAACCTACC TTTCTACGGA CGTGGGATCC TGCACCCTCG TCTGCCCCCT GCACAACCAA
961    GAGGTGACAG CAGAGGATGG AACACAGCGG TGTGAGAAGT GCAGCAAGCC CTGTGCCCGA
1021   GTGTGCTATG GTCTGGGCAT GGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC CAGTGCCAAT
1081   ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTCTT GCCGGAGAGC
1141   TTTGATGGGG ACCCAGCCTC CAACACTGCC CCGCTCCAGC CAGAGCAGCT CCAAGTGTTT
1201   GAGACTCTGG AAGAGATCAC AGGTACCTA TACATCTCAG CATGGCCGGA CAGCCTGCCT
1261   GACCTCAGCG TCTTCCAGAA CCTGCAAGTA ATCCGGGGAC GAATTCTGCA CAATGGCGCC
1321   TACTCGCTGA CCCTGCAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCGCTC ACTGAGGGAA
1381   CTGGGCAGTG GACTGGCCCT CATCCACCAT AACACCCACC TCTGCTTCGT GCACACGGTG
1441   CCCTGGGACC AGCTCTTTCG GAACCCGCAC CAAGCTCTGC TCCACACTGC CAACCGGCCA
1501   GAGGACGAGT GTGTGGGCGA GGGCCTGGCC TGCCACCAGC TGTGCGCCCG AGGGCACTGC
1561   TGGGGTCCAG GGCCACCCA GTGTGTCAAC TGCAGCCAGT TCCTTCGGGG CCAGGAGTGC
1621   GTGGAGGAAT GCCGAGTACT GCAGGGGCTC CCCAGGGAGT ATGTGAATGC CAGGCACTGT

```

```

1681 TTGCCGTGCC ACCCTGAGTG TCAGCCCCAG AATGGCTCAG TGACCTGTTT TGGACCGGAG
1741 GCTGACCAGT GTGTGGCCTG TGCCCACTAT AAGGACCCTC CCTTCTGCGT GGCCCGCTGC
1801 CCCAGCGGTG TGAACCTGA CCTCTCCTAC ATGCCCATCT GGAAGTTTCC AGATGAGGAG
1861 GGCGCATGCC AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCCACTCCT GTGTGGACCT GGATGACAAG
1921 GGCTGCCCCG CCGAGCAGAG AGCCAGCCCT CTGACGTCCA TCATCTCTGC GGTGGTTGGC
1981 ATTCTGCTGG TCGTGGTCTT GGGGGTGGTC TTTGGGATCC TCATCAAGCG ACGGCAGCAG
2041 AAGATCCGGA AGTACACGAT GCGGAGACTG CTGCAGGAAA CGGAGCTGGT GGAGCCGCTG
2101 ACACCTAGCG GAGCGATGCC CAACCAGGCG CAGATGCGGA TCCTGAAAGA GACGGAGCTG
2161 AGGAAGTGTA AGGTGCTTGG ATCTGGCGCT TTTGGCACAG TCTACAAGGG CATCTGGATC
2221 CCTGATGGGG AGAATGTGAA AATTCCAGTG GCCATCAAAG TGTGAGGGA AAACACATCC
2281 CCCAAAGCCA ACAAAGAAAT CTTAGACGAA GCATACGTGA TGGCTGGTGT GGGCTCCCCA
2341 TATGTCTCCC GCCTTCTGGG CATCTGCCTG ACATCCACGG TGCAGCTGGT GACACAGCTT
2401 ATGCCCTATG GCTGCCTCTT AGACCATGTC CGGGAAAACC GCGGACGCCT GGGCTCCCAG
2461 GACCTGCTGA ACTGGTGTAT GCAGATTGCC AAGGGGATGA GCTACCTGGA GGATGTGCGG
2521 CTCGTACACA GGGACTTGGC CGCTCGGAAC GTGCTGGTCA AGAGTCCCAA CCATGTCAAA
2581 ATTACAGACT TCGGGCTGGC TCGGCTGCTG GACATTGACG AGACAGAGTA CCATGCAGAT
2641 GGGGGCAAGG TGCCCATCAA GTGGATGGCG CTGGAGTCCA TTCTCCGCCG GCGGTTCAAC
2701 CACCAGAGTG ATGTGTGGAG TTATGCTGTG ACTGTGTGGG AGCTGATGAC TTTTGGGGCC
2761 AAACCTTACG ATGGGATCCC AGCCCGGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA GGGGGAGCGG
2821 CTGCCCCAGC CCCCCATCTG CACCATGAT GTCTACATGA TCATGGTCAA ATGTTGGATG
2881 ATTGACTCTG AATGTCGGCC AAGATTCCGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC CCGCATGGCC
2941 AGGGACCCCC AGCGCTTTGT GGTCAATCCAG AATGAGGACT TGGGGCCAGC CAGTCCCTTG
3001 GACAGCACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGGACCT GGTGGATGCT
3061 GAGGAGTATC TGGTACCCCA GCAGGGCTTC TTCTGTCCAG ACCCTGCCCC GGGCGCTGGG
3121 GGCATGGTCC ACCACAGGCA CCGCAGCTCA TCTACCAGGA GTGGCGGTGG GGACCTGACA
3181 CTAGGGCTGG AGCCCTCTGA AGAGGAGGCC CCCAGGTCTC CACTGGCACC CTCCGAAGGG
3241 GCTGGCTCCG ATGTATTGTA TGGTGACCTG GGAATGGGGG CAGCCAAGGG GCTGCAAAGC
3301 CTCCCCACAC ATGACCCAG CCCTCTACAG CGGTACAGTG AGGACCCAC AGTACCCCTG
3361 CCCTCTGAGA CTGATGGCTA CGTTGCCCCC CTGACCTGCA GCCCCAGCC TGAATATGTG
3421 AACCAGCCAG ATGTTCTGGCC CCAGCCCCCT TCGCCCCGAG AGGGCCCTCT GCCTGCTGCC
3481 CGACCTGCTG GTGCCACTCT GGAAAGGCCC AAGACTCTCT CCCCAGGGAA GAATGGGCTC
3541 GTCAAAGACG TTTTTCCTT TGGGGGTGCC GTGGAGAACC CCGAGTACTT GACACCCAG
3601 GGAGGAGCTG CCCCTCAGCC CCACCTCCT CCTGCCTTCA GCCCAGCCTT CGACAACCTC
3661 TATTACTGGG ACCAGGACCC ACCAGAGCGG GGGGCTCCAC CCAGCACCTT CAAAGGGACA
3721 CCTACGGCAG AGAACCAGA GTACCTGGGT CTGGACGTGC CAGTGTGA

```


LISTA DE SECVENȚE

- <110> EISAI CO., LTD.
EISAI INC.
- 5 <120> MORPHOTEK, INC.
<120> CONJUGAȚI ANTICORP-MEDICAMENT PE BAZĂ DE ERIBULINĂ ȘI METODE DE UTILIZARE
- <130> 08061,0024-00304
- <140> PCT/US2017/020529
- 10 <141> 02-03-2017
<150> 62/302,562
<151> 02-03-2016
<160> 368
<170> PatentIn versiunea 3.5
- 15 <210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
- 20 <221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
<400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Val | Val | Gln | Pro | Gly | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ser | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Gly | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Leu | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Val |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Met | Ile | Ser | Ser | Gly | Gly | Ser | Tyr | Thr | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Ala | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Thr | Leu | Phe |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Gln | Met | Asp | Ser | Leu | Arg | Pro | Glu | Asp | Thr | Gly | Val | Tyr | Phe | Cys |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Arg | His | Gly | Asp | Asp | Pro | Ala | Trp | Phe | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |

```

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130                      135                      140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145                      150                      155                      160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                      165                      170                      175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
                      180                      185                      190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195                      200                      205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210                      215                      220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225                      230                      235                      240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                      245                      250                      255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                      260                      265                      270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275                      280                      285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290                      295                      300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305                      310                      315                      320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                      325                      330                      335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                      340                      345                      350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355                      360                      365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370                      375                      380

```

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 2

Gly Tyr Gly Leu Ser

10 1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

15 <220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 3

Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

20 <210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

25 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 4

His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 5

30 <211> 468

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 5

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

176

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	1	5	10	15
Val	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	20	25	30	
Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ser	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	35	40	45	
Ser	Gly	Tyr	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	50	55	60	
Glu	Trp	Val	Ala	Met	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	65	70	75	80
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	85	90	95	
Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly	Val	100	105	110	
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	His	Gly	Asp	Asp	Pro	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	115	120	125	
Gly	Gln	Gly	Thr	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	130	135	140	
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	145	150	155	160
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	165	170	175	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro				

180	185	190
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 195 200 205		
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 210 215 220		
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser 225 230 235 240		
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 245 250 255		
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 260 265 270		
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 275 280 285		
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 290 295 300		
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 305 310 315 320		
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 325 330 335		
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 340 345 350		
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 355 360 365		
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 370 375 380		
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 385 390 395 400		
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 405 410 415		
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 420 425 430		
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 435 440 445		
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 450 455 460		

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 6

5 <211> 217

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 6

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10						15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		

Asn	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Trp
		35					40					45			

Ile	Tyr	Gly	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				

Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln
65					70					75					80

Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro
				85					90					95	

Tyr	Met	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
			100					105					110		

Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu
		115					120					125			

Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
	130					135					140				

Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
145					150				155						160

Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
				165					170					175	

Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His
			180					185					190		

Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
		195					200					205			

Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
	210					215		

10 <210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

15 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 7

Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Leu	His
1					5			10			

<210> 8

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 5 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 8
 Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 9
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 15 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 9
 Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 236
 20 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 25 <400> 10

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

180

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ile
35 40 45

Ser Ser Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 11

5 <211> 1407

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

10 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

<400> 11

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgag	60
gtccaactgg tggagagcgg tggaggtgtt gtgcaacctg gccggtccct gcgcctgtcc	120
tgctccgcat ctggcttcac cttcagcggc tatgggttgt cttgggtgag acaggcacct	180
ggaaaaggtc ttgagtgggt tgcaatgatt agtagtgggt gtagttatac ctactatgca	240
gacagtgtga agggtagatt tgcaatatcg cgagacaacg ccaagaacac attgttctctg	300
caaatggaca gcctgagacc cgaagacacc ggggtctatt tttgtgcaag acatggggac	360
gatcccgctt ggctcgctta ttggggccaa gggaccccg taccgtctc ctcagcctcc	420
accaagggcc catcggtctt ccccttgga ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca	480
gcggccctgg gctgcctgg caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtctgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctcaggactc	600
tactccctca gcagcgtgg gaccgtgcc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc	660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagttga gcccaaactc	720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	780
gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac cctgaggtc	840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1020
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaacat ctccaagcc	1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1260
tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcgagaag	1380
agcctctccc tgtctcccg gaaatga	1407

<210> 12

5 <211> 711

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

10 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

<400> 12

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgac      60
atccagctga cccagagccc aagcagcctg agcgcacagc tgggtgacag agtgaccatc      120
acctgtagtg tcagctcaag tataagtcc aacaacttgc actggtacca gcagaagcca      180
ggtaaggctc caaagccatg gatctacggc acatccaacc tggcttctgg tgtgccaagc      240
agattcagcg gtagcggtag cggtagcgac tacaccttca ccatcagcag cctccagcca      300
gaggacatcg ccacctacta ctgccaacag tggagtagtt acccgtagat gtacacgttc      360
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc      420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      480
ttctatocca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac      540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat      660
cagggcctga gctcgccctg cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta a              711
<210> 13
<211> 8
<212> PRT
5 <213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 13
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly
10 1 5
<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Secvență artificială
15 <220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 14
Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr
1 5
20 <210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
25 <221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 15
Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 16
30 <211> 7
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 16
Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn
1 5
<210> 17
<211> 3
40 <212> PRT

```

<213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 5 <400> 17
 Gly Thr Ser
 1
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 18
 15 **Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr**
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 257
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

```

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1      5      10      15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
20      25      30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35      40      45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
50      55      60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65      70      75      80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85      90      95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100     105     110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
115     120     125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
130     135     140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145     150     155     160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
165     170     175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180     185     190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195     200     205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210     215     220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225     230     235     240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
245     250     255

```

```

Ser
<210> 20
5 <211> 982
  <212> ADN
  <213> Homo sapiens
  <400> 20

```

```

cattccttgg tgccactgac cacagctcct tcttcagggg cagacatggc tcagcggatg      60
acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg      120
attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa      180
aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc      240
tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac      300
tggaaccoact gtggagagat ggcacctgoc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc      360
ctctacgagt gctcccccac cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc      420
aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat      480
tgtcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg      540
tttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caacctttcc atttctactt ccccacaccc      600
actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tcctacaagg tcagcaacta cagccgaggg      660
agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggagggtg      720
gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggccct gggcagcctg gcctttcctg      780
cttagcctgg ccctaagtct gctgtggctg ctcatctgac ctctttttac cttctgatac      840
ctggaaatcc ctgccctgtt cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg      900
tcgggcctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat      960
ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa                                          982

```

<210> 21

<211> 1255

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

```

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1              5              10              15

```

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

186

Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Cys	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Lys
			20					25					30		
Leu	Arg	Leu	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	His
		35					40					45			
Leu	Tyr	Gln	Gly	Cys	Gln	Val	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Thr	Tyr
	50					55					60				
Leu	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Gln	Glu	Val
65					70					75					80
Gln	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	His	Asn	Gln	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Leu
				85					90					95	
Gln	Arg	Leu	Arg	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Asn	Tyr
			100					105						110	
Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu	Asn	Asn	Thr	Thr	Pro
		115					120					125			
Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser
	130						135				140				
Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Lys	Gly	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Asn	Pro	Gln
145					150					155					160
Leu	Cys	Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Leu	Trp	Lys	Asp	Ile	Phe	His	Lys	Asn
				165					170					175	
Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys
			180					185						190	
His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser
		195					200					205			
Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys
	210					215					220				
Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys
225					230					235					240
Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu
				245					250					255	
His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val

260	265	270
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg 275 280 285		
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu 290 295 300		
Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln 305 310 315 320		
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys 325 330 335		
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu 340 345 350		
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys 355 360 365		
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp 370 375 380		
Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe 385 390 395 400		
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro 405 410 415		
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg 420 425 430		
Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu 435 440 445		
Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly 450 455 460		
Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val 465 470 475 480		
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr 485 490 495		
Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His 500 505 510		

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575
 Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590
 Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605
 Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620
 Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640
 Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
 645 650 655
 Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670
 Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685
 Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 690 695 700
 Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
 705 710 715 720
 Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 725 730 735
 Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750
 Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765


```

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770              775              780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785              790              795              800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
              805              810              815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
              820              825              830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
      835              840              845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
      850              855              860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865              870              875              880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
              885              890              895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
      900              905              910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
      915              920              925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
      930              935              940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945              950              955              960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
              965              970              975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
              980              985              990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
      995              1000              1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
 1010              1015              1020

```

190

1250 1255

<210> 22

<211> 3768

<212> ADN

<213> Homo sapiens

 $\langle 400 \rangle$ 22

atggagctgg	cggccttgtg	ccgctggggg	ctcctcctcg	ccctcttgcc	ccccggagcc	60
gcgagcacc	aagtgtgcac	cggcacagac	atgaagctgc	ggctccctgc	cagtcccgag	120
accacactgg	acatgctccg	ccacctctac	cagggctgcc	aggtggtgca	gggaaacctg	180
gaactcacct	acctgccac	caatgccagc	ctgtccttcc	tgcaggatat	ccaggagggtg	240
cagggtctacg	tgtctcatgc	tcacaaccaa	gtgaggcagg	tccactgca	gagggtgcgg	300
attgtgcgag	gcaccagct	ctttgaggac	aactatgcc	tggccgtgct	agacaatgga	360
gaccgcctga	acaataccac	ccctgtcaca	ggggcctccc	caggaggcct	gcgggagctg	420
cagcttcgaa	gcctcacaga	gatcttgaaa	ggaggggtct	tgatccagcg	gaacccccag	480
ctctgctacc	aggacacgat	tttgtggaag	gacatcttcc	acaagaacaa	ccagctggct	540
ctcacactga	tagacaccaa	ccgctctcgg	gcctgccacc	cctgttctcc	gatgtgtaag	600
ggctcccgct	gctggggaga	gagttctgag	gattgtcaga	gcctgacgcg	cactgtctgt	660
gccggtggct	gtgcccgctg	caaggggcca	ctgccactg	actgctgcca	tgagcagtgt	720
gctgccggct	gcacggggcc	caagcactct	gactgcctgg	cctgcctcca	cttcaaccac	780
agtggcatct	gtgagctgca	ctgccagacc	ctggtcacct	acaacacaga	cacgtttgag	840
tccatgcca	atcccgaggg	ccggtataca	ttcgggcgcca	gctgtgtgac	tgccgtgcc	900
tacaactacc	ttttctacgga	cgtgggatcc	tgacccctcg	tctgccccct	gcacaaccaa	960
gaggtgacag	cagaggatgg	aacacagcgg	tgtgagaagt	gcagcaagcc	ctgtgcccg	1020
gtgtgctatg	gtctgggcat	ggagcacttg	cgagagggtga	gggcagttac	cagtgccaat	1080
atccaggagt	ttgttggtcg	caagaagatc	tttggggagcc	tggcatttct	gccggagagc	1140
tttgatgggg	accagacctc	caacactgcc	ccgctccagc	cagagcagct	ccaagtgttt	1200
gagactctgg	aagagatcac	aggttacct	tacatctcag	catggccgga	cagcctgcct	1260
gacctcagcg	tcttccagaa	cctgcaagta	atccggggac	gaattctgca	caatggcgcc	1320
tactcgctga	ccctgcaagg	gctgggcata	agctggctgg	ggctgcgctc	actgagggaa	1380
ctgggcagtg	gactggccct	catccaccat	aacaccacc	tctgcttctg	gcacacgggtg	1440
ccctgggacc	agctctttcg	gaaccgcac	caagctctgc	tccacactgc	caaccggcca	1500
gaggacgagt	gtgtgggcga	gggcctggcc	tgccaccagc	tgtgcgcccg	agggcactgc	1560
tggggctccag	ggcccaccca	gtgtgtcaac	tgcagccagt	tccttcgggg	ccaggagtgc	1620

gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt	1680
ttgcogtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag	1740
gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgtgc	1800
cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgccatct ggaagtttcc agatgaggag	1860
ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag	1920
ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc ggtggttggc	1980
attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag	2040
aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg	2100
acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg	2160
aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc	2220
cctgatgggg agaatgtgaa aattccagtg gccatcaaag tgttgaggga aaacacatcc	2280
cccaaagcca acaaaagaat cttagacgaa gcatacgtga tggctggtgt gggctcccca	2340
tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt	2400
atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gggacgcct gggctccag	2460
gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg	2520
ctcgtacaca gggacttggc cgtcgggaac gtgctggtca agagteccaa ccatgtcaaa	2580
attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat	2640
gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccg gcggttcacc	2700
caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc	2760
aaacottacg atgggatccc agccggggag atccctgacc tgcctgaaaa gggggagcgg	2820
ctgcccagc ccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtcaa atgttggatg	2880
attgactctg aatgtcgccc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc ccgcattggc	2940
agggaccccc agcgttttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccagc cagtcccttg	3000
gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggaact ggtggatgct	3060
gaggagtatc tggtacccc gacgggcttc ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg	3120
ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca	3180
ctagggtctg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc cactggcacc ctccgaaggg	3240
gctggctccg atgtatttga tggtagctg ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc	3300
ctccccacac atgaccccag cctctacag cggtagagtg aggacccac agtaccctg	3360
ccctctgaga ctgatggcta cgttgcctcc ctgacctgca gccccagcc tgaatatgtg	3420
aaccagccag atgttcggcc ccagccccct tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc	3480
cgacctgctg gtgccactct ggaaggccc aagactctct cccagggaa gaatggggtc	3540
gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacacccag	3600
ggaggagctg cccctcagcc ccaccctcct cctgccttca gccagcctt cgacaacctc	3660
tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaagggaca	3720
cctacggcag agaaccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtga	3768

<210> 23

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 24

<211> 110

<212> PRT

<213> Secvență artificială

10

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 24

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
85 90 95

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15

<210> 25

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

5 <400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Ser Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26

10 <211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

15 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 26

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 27

<211> 120

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 10 <210> 28
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 28
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 20 <210> 29
 <211> 123

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 29
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
 20 25 30

 Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
 35 40 45

 Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80

 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile
 85 90 95

 Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
 100 105 110

 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 30
 <211> 112
 10 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 15 <400> 30
 Glu Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
 20 25 30

 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
 65 70 75 80

 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
 85 90 95

 Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 31
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp
 20 25 30

 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

 Gly Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60

 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

 Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

 Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 10 115 120 125
 <210> 32
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 33

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 33

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
20 25 30

10 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34

<211> 108

15 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 34

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Ile Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
 65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
 85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105

<210> 35

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

10 <400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36

<211> 108

<212> PRT

15 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37

<211> 114

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 37

Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ala Pro
65 70 75 80

Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr
85 90 95

Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Leu

<210> 38

<211> 110

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 38

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
85 90 95

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 39

5 <211> 117

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

10 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 40

<211> 110

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 40

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Tyr	Arg	Val
			20					25					30		

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Asp	Thr	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50						55				60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Cys
65					70					75					80

Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser
				85					90					95	

Tyr	Gly	Ile	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110

5 <210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

10 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 41

Gln	Ser	Val	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Lys	Pro	Asp	Glu	Ser
1				5					10					15	

Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ala
			20					25					30		

Met	Ile	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
		35					40					45			

Thr	Ile	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	Gly
	50					55					60				

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Ile	Thr
65					70					75					80

Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly	Gly
				85					90					95	

Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp
					100			105					110		

Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120		

<210> 42

15 <211> 112

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 42

Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Ser	Ala	Ala	Val	Gly
1				5					10					15	

Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Gln	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Asn	Asn
			20					25					30		

Asn	Asn	Leu	Ala	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu
		35					40					45			

Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
50						55					60				

5	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Val
	65					70					75				80	

Gln	Cys	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gly	Gly	Cys	Asp	Asp
				85					90					95	

Asp	Ala	Asp	Thr	Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Val	Val	Val	Lys
			100					105					110		

<210> 43

<211> 125

10 <212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

15 <400> 43

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

Ala	Met	Ile	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			

Gly	Thr	Ile	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys
50						55					60				

Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
65						70				75				80	

Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	

Arg	Gly	Gly	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Phe
			100					105					110		

Asp	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120					125

<210> 44

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 5 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 44
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
 20 25 30
 Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Cys Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
 85 90 95
 Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 45
 10 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 15 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 45
 gaggtccaac tgggtggagag cgggtggaggt gttgtgcaac ctggccggtc cctgcgcctg 60
 tcctgctccg catctggctt caccttcagc ggctatgggt tgtcttgggt gagacaggca 120
 cctggaaaag gtcttgagtg ggttgcaatg attagtagtg gtggtagtta tacctactat 180
 gcagacagtg tgaagggtag atttgcaata tcgcgagaca acgccaagaa cacattgttc 240
 ctgcaaatgg acagcctgag acccgaagac accggggtct atttttgtgc aagacatggg 300
 gacgatcccg cctgggttcgc ttattggggc caagggaccc cggtcaccgt ctccctca 357
 <210> 46
 <211> 330
 20 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 25 <400> 46

	gacatccagc tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc	60
	atcacctgta gtgtcagctc aagtataagt tccaacaact tgcactggta ccagcagaag	120
	ccaggtaagg ctccaaagcc atggatctac ggccatcca acctggcttc tgggtgcca	180
	agcagattca gcggtagcgg tagcggtagc gactacacct tcaccatcag cagcctcag	240
	ccagaggaca tcgccaccta ctactgccaa cagtggagta gttaccgta catgtacacg	300
	ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa	330
	<210> 47	
	<211> 357	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 47	
	caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata	60
	tcctgcaagg cttctgggta ctcatctact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc	120
	catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatgggtc ttctagctac	180
	aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac	240
	atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aagggggggt	300
10	tacgacggga ggggttttga ctactgggga tccgggaccc cggtcaccgt ctctca	357
	<210> 48	
	<211> 318	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
15	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 48	
	gacatcgagc tcaactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
	atgacctgca tgccagctc aagtgtaatg tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc	120
	acctcccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccaggtcgc	180
	ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacia tcagcagcgt ggaggtgaa	240
	gatgatgcaa cttattactg ccagcagtgg agtaagcacc ctctcacgtt cggatccggg	300
	accaaggtgg aaatcaaa	318
20	<210> 49	
	<211> 369	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
25	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 49	

	cagtcggtgg aggagtcgag gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc	60
	tgcaccgtct ctggaatctc cctcagtagc gatgcaataa gctgggtccg ccaggetcca	120
	gggaaggggc tcgaatacat cggaatcatt aatgggtggtg gtaacacata ctacgcgagc	180
	tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cgggtgatct gaaaatcacc	240
	agtcgcgaaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgccg gaggcattca acatggtggt	300
	ggtaaatagt attattatta ttacggcatg gacctctggg gccagggcac cctggtoact	360
	gtctcttca	369
	<210> 50	
	<211> 336	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 50	
	gaagtgttga tgaccagac tccatcctcc gtgtctgcag ctgtgggaga cacagtcacc	60
	atcaagtgcc aggcagtcga gagcattagt agtgtcttgt cctgggtatca gcagaaacca	120
	gggcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcctccactc tggcatctgg ggtcccatcg	180
	cggttcagcg gcagtagatc tgggacagag ttactctca ccatcagcga cctggagtgt	240
	gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaacc aattatggta ctagtagtag taattatggt	300
10	tttgccttcg gcggaggagc cgaggtggtc gtcaaa	336
	<210> 51	
	<211> 378	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
15	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 51	
	gaagtccaac tgggtgaaag cgggggagga ctggtgcagc cgggcggatc cctccggctg	60
20	tcattgtgctg catcggaat ttccctctcc tccgacgcga ttagctgggt cagacaggcc	120
	cccggaaagg ggctggagta catcggtatc atcaacggcg gcggaaacac ctactacgcc	180
	tcctgggcca agggccgctt caccatctcg cggcataatt ccaagaacac tctgtacttg	240
	caaatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcgcg cggcatccag	300
	cacggtggtg gaaacagcga ctactactac tatgggatgg atctgtgggg ccagggaact	360
	cttgtgaccg tgctgtca	378
	<210> 52	
	<211> 336	
	<212> ADN	
25	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 52	

	gacattcaga tgaccagtc cccaagctcg ctgtccgcct ccgtgggoga ccgcgtgacc	60
	atcacgtgcc aggcgtccca gtcaattagc agcgtgctct cctggtagca acagaagccg	120
	gggaaagcac ccaagctgct gatctacttg gcctccactc tggcctcggg agtgccttca	180
	cggttctccg gatcgggatc tggtagtgat ttcaacctca ccatctcgag ccttcagtgc	240
	gaggacatcg ctacttacta ttgtcaaacc aactacggaa cctccagctc caactacggc	300
	tttgccttcg gtggcgggac caaggtcgaa atcaaa	336
	<210> 53	
	<211> 354	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 53	
	cagtcggtgg aggagtcggtg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccctc gacactcacc	60
	tgcacagtct ctggattctc cctcaataac tatgcaatga gctgggtccg ccaggtccca	120
	gggaaggggc tggaatggat cggatccatt agtactggtg gtctcgcatc ctacgcgaac	180
	tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtaggatc gaaaatgacc	240
	agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtggca gaaatggtgg tggtagttat	300
10	attttctatt attttgactt gtggggccaa ggcacctcg tcaactgtctc ttca	354
	<210> 54	
	<211> 324	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
15	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 54	
	gcattcgaat tgaccagac tccatctctc gtggaggcag ctgtgggagg cacaatcacc	60
	atcaagtgcc aggcagtcga gagcattagt agttacttat cctggtagca gcagaaacca	120
	gggcagcctc ccaagctcct gatctattct gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg	180
	cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcga cctggagtgt	240
	gccgatgctg ccacttactt ctgtcaaagc tattatgata ttggtactag tactttcggc	300
	ggagggaccg aggtggtcgt caaa	324
20	<210> 55	
	<211> 363	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
25	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 55	

	gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg	60
	tcttgtgccc cctccggctt ctccctgaac aactacgcca tgtcctgggt gcgacaggcc	120
	cctggcaaag gcctggaatg gatcggtcc atcagcacag gcggcctggc cttctaogcc	180
	aattgggcca agggccgggt caccatcagc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctc	240
	cagatgaact ccctgcccgc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aaacggcgga	300
	ggctcctaca tcttctacta cttcgacctg tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtca	360
	tct	363
	<210> 56	
	<211> 324	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 56	
	gatattcaga tgaccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtggcgga cagagtgacc	60
10	atcacctgtc aggcctccca gtccatctcc tctacacctg cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctactct gccctccacac tggcctccgg cgtgccctct	180
	agattctccg gctctggctc tggcacccagc tttacctga ccatcagctc cctccagtgc	240
	gaggatgccg ccacctacta ctgccagtcc tactacgaca tcggcacctc caccttcggc	300
	ggaggcacca aggtggaaat caaa	324
	<210> 57	
	<211> 342	
15	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
20	<400> 57	
	cagtcagtga aggagtccgg gggtcgctg gtcacgcctg ggacaccctt gacactcacc	60
	tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc tatgcaatgg gctgggtccg ccaggctcca	120
	gggaaggggc tggaatacat cggaaccatt aatattggtg gtcgcgtata ttacgcgagc	180
	tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cgggtgatct gaaagcgccc	240
	agtctgacag ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gatattataa tgggtgtagt	300
	tatgacatct ggggccagg caccctggtc accgtctctt ta	342
	<210> 58	
	<211> 330	
	<212> ADN	
25	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 58	

	gatgttgtga tgaccagac tccagcctcc gcgtctgaac ctgtgggagg cacagtcacc	60
	atcaagtgcc aggcagtgag gagcatttat cgcgtatttg cctgggtatca gcagaaacca	120
	gggcagcctc ccaagctcct gatctatgat acatccactc tggcatctgg ggccccatcg	180
	cggttcaaag gcagtggata tgggacagag ttactctca ccatcagcgg cgtgcagtgt	240
	gaagatgctg ccaacttacta ctgtcaaggc ggttattatg ctgatatgta tggatttgct	300
	ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa	330
	<210> 59	
	<211> 351	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 59	
	caggtgcagc tgggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg	60
	tcctgttccg cctccggaat cgacctgtcc tctacgcta tgggctgggt gcgacaggct	120
	cctggcaagg gcctggagta catcggcacc atcaacatcg gcggcagagt gtactacgcc	180
	tcctgggcca agggccgggt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc	240
	cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtactacaac	300
10	ggcggctcct acgatatctg gggccagggc aactcgtga ccgtgtcctc t	351
	<210> 60	
	<211> 330	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
15	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 60	
	gatattcaga tgaccagtc cccctccacc ctgtctgcct ctgtgggga cagagtgacc	60
	atcacctgtc aggcctcga gtccatctac cgggtgctgg cctgggtatca gcagaagcct	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac accagcacac tggcctccgg cgtgccctct	180
	agattctccg gctctggctc tggcaccgag ttaccctga ccatctccag cctccagtgc	240
	gacgacgccg ccacctacta ttgtcagggc ggctactacg ccgactccta cggaatcgct	300
	ttcggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa	330
20	<210> 61	
	<211> 366	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
25	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 61	
	cagtcgggtg aggagtccgg cggctgcctg gtaaagcctg acgaatccct gacactcacc	60
	tgcacagcct ctggattctc cctcagtagt tatgcaatga tctgggtccg ccaggctcca	120
	ggggaggggc tggaatgat cggaaccatt agtactggtg gtatcacata ctacgcgagc	180
	tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cgggtggatct gaaaatcacc	240
	agtcggacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gagggggata tgctgctagt	300

	agtgccttatt atctcccgta ctactttgac ttgtggggcc aagggaccct ggtcacccgc	360
	tccctca	366
	<210> 62	
	<211> 336	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 62	
	gcagccgtgc tgaccagac accatcaccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc	60
	atcagttgcc agtcagtcga gagggtttat aataataaca acttagcctg gtttcagcag	120
	aaaccggggc agcctcccaa gcttctgacg tatctggcat ccactctggc atctggggtc	180
	ccatcacggg tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcggcgtg	240
	cagtgtgacg atgctgccac ttattactgt ctagggtggt gtgatgatga tgctgatact	300
10	tttgctttcg gcggaggac tgagggtggt gtcaaa	336
	<210> 63	
	<211> 375	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
15	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 63	
	gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcgatc tctgagactg	60
	tcttgtgccg cctccgctt ctccctgtcc tctacgcta tgatctgggt gcgacaggcc	120
	cctggcaagg gcctggaatg gatcggcacc atctctaccg gcggaattac ctactacgcc	180
	tcctggggca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc	240
	cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgctag aggcggctac	300
	gccgccagct ccgcttacta cctgccctac tacttcgacc tgtggggcca gggcaccctc	360
	gtgacagtgt catct	375
20	<210> 64	
	<211> 336	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
25	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 64	
	gatattcaga tgaccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc agtccctcca gtccgtgtat aacaacaaca acctggcctg gtatcagcag	120
	aaaccgggca aggtgcccaa gctgctgacg tacctggcct ccacactggc ctctggcgtg	180
	ccctctagat tctccggctc tggctctggc accgacttta ccctgaccat cagctccctc	240
	cagtgcgagg atgccgccac ctactattgc ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc	300
	tttgcttttg gcggaggcac caagggtgaa atcaaa	336
	<210> 65	
30	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 65
 Gly Tyr Thr Met Asn
 1 5
 5 <210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 66
 Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
 1 5 10 15

 Gly
 <210> 67
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 67
 Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 68
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 30 <400> 68
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 69
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5
 40 <210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 45 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 70
 Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
 1 5
 50 <210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>

```

<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 71
  Asp Thr Tyr Ile His
  1           5
5  <210> 72
    <211> 17
    <212> PRT
    .01.0 Secvență artificială
    <220>
10  <221> sursă
    <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
    <400> 72
    Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    1           5           10           15

    Gly
    <210> 73
15  <211> 11
    <212> PRT
    <213> Secvență artificială
    <220>
    <221> sursă
20  <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
    <400> 73
    Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
    1           5           10
    <210> 74
    <211> 11
25  <212> PRT
    <213> Secvență artificială
    <220>
    <221> sursă
    <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
30  <400> 74
    Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
    1           5           10
    <210> 75
    <211> 7
    <212> PRT
35  <213> Secvență artificială
    <220>
    <221> sursă
    <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
    <400> 75
    Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
40  1           5
    <210> 76
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Secvență artificială
45  <220>
    <221> sursă
    <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
    <400> 76
    Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
    1           5
50  <210> 77
    <211> 5
    <212> PRT
    <213> Secvență artificială
    <220>

```


<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 77
 Ser Asp Ala Ile Ser
 1 5
 5 <210> 78
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 78
 Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 79
 15 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 79
 Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15

 Asp Leu
 <210> 80
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 30 <400> 80
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val Leu Ser
 1 5 10
 <210> 81
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 81
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 40 <210> 82
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 45 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 82
 Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
 1 5 10
 50 <210> 83
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 83
Ser Asp Ala Ile Ser
 1 5
 5 <210> 84
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 84
Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 85
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 85
Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Leu
 <210> 86
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 30 <400> 86
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val Leu Ser
 1 5 10
 <210> 87
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 87
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 40 1 5
 <210> 88
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 45 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 88
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
 1 5 10
 50 <210> 89
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 89
Asn Tyr Ala Met Ser
 1 5
 5 <210> 90
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 90
Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 91
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 91
Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 <210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 30 <400> 92
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10
 <210> 93
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 93
Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 40 1 5
 <210> 94
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 45 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 94
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
 1 5 10
 50 <210> 95
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 55 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

```

<400> 95
  Asn Tyr Ala Met Ser
  1             5
<210> 96
<211> 16
5  <212> PRT
    <213> Secvență artificială
    <220>
    <221> sursă
    <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
10  <400> 96
    Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
    1             5             10             15
    <210> 97
    <211> 13
    <212> PRT
15  <213> Secvență artificială
    <220>
    <221> sursă
    <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
    <400> 97
    Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
20  1             5             10
    <210> 98
    <211> 11
    <212> PRT
    <213> Secvență artificială
25  <220>
    <221> sursă
    <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
    <400> 98
    Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
    1             5             10
30  <210> 99
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secvență artificială
    <220>
35  <221> sursă
    <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
    <400> 99
    Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
    1             5
40  <210> 100
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> Secvență artificială
    <220>
    <221> sursă
45  <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
    <400> 100
    Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
    1             5             10
    <210> 101
    <211> 5
50  <212> PRT
    <213> Secvență artificială
    <220>
    <221> sursă
    <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
55  <400> 101
    Ser Tyr Ala Met Gly
    1             5

```

<210> 102
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 102
 Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 103
 Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
 1 5
 20 <210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 104
 Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val Leu Ala
 1 5 10
 <210> 105
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 35 <400> 105
 Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 106
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 106
 Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
 45 1 5 10
 <210> 107
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 107
 Ser Tyr Ala Met Gly
 1 5
 55 <210> 108
 <211> 16

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 108
 Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 109
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 15 <400> 109
 Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
 1 5
 <210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 110
 Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val Leu Ala
 1 5 10
 25 <210> 111
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 30 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 111
 Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 35 <210> 112
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 40 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 112
 Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
 1 5 10
 45 <210> 113
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 50 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 113
 Ser Tyr Ala Met Ile
 1 5
 <210> 114
 <211> 16
 55 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 114
 Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 5 <210> 115
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 115
 Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Leu
 15 <210> 116
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 116
 Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Ala
 1 5 10
 <210> 117
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 30 <400> 117
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 118
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 118
 Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
 1 5 10
 40 <210> 119
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 45 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 119
 Ser Tyr Ala Met Ile
 1 5
 50 <210> 120
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 120
 Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 5 <210> 121
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 121
 Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Leu
 15 <210> 122
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 122
 Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Ala
 1 5 10
 <210> 123
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 30 <400> 123
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 124
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 124
 Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
 1 5 10
 40 <210> 125
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 45 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 125
 ggctatgggt tgtct 15
 50 <210> 126
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 55 <221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 126
 atgattagta gtggtggttag ttatacctac tatgcagaca gtgtgaaggg t 51
 <210> 127
 5 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 10 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 127
 catggggacg atcccgctg gttegttat 30
 <210> 128
 <211> 36
 15 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 20 <400> 128
 agtgcagct caagtataag ttcaacaac ttgcac 36
 <210> 129
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 129
 30 ggcacatcca acctggcttc t 21
 <210> 130
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 35 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 130
 caacagtgga gtagttacc gtacatgtac acg 33
 40 <210> 131
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 45 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 131
 ggctacacca tgaac 15
 <210> 132
 50 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 55 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 132
 ctattactc cttaaatgg tgettetage tacaaccaga agttcagggg c 51
 <210> 133
 <211> 30
 60 <212> ADN
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 133
 5 ggggggttacg acgggagggg tttgactac 30
 <210> 134
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 134
 agtgccagct caagtgaag ttacatgcac 30
 15 <210> 135
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 135
 gacacatcca aactggcttc t 21
 <210> 136
 25 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 30 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 136
 cagcagtgga gtaagcacc tctcag 27
 <210> 137
 <211> 15
 35 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 40 <400> 137
 agcgatgcaa taagc 15
 <210> 138
 <211> 48
 <212> ADN
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 138
 50 atcattaatg gtggtggtaa cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48
 <210> 139
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 55 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 139
 ggcatcaac atggtggtgg taatagtgat tattattatt acggcatgga cctc 54
 60 <210> 140
 <211> 33

<212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 140
 caggccagtc agagcattag tagtgtcttg tcc 33
 <210> 141
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 15 <400> 141
 ctggcatcca ctctggcatc t 21
 <210> 142
 <211> 42
 <212> ADN
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 142
 25 caaaccaatt atggtactag tagtagtaat tatggttttg ct 42
 <210> 143
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 30 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 143
 tccgacgcga ttagc 15
 35 <210> 144
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 40 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 144
 atcatcaacg gcggcggaaa cacctactac gcctcctggg ccaagggc 48
 <210> 145
 45 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 50 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 145
 ggcatccagc acggtggtgg aaacagcgac tactactact atgggatgga tctg 54
 <210> 146
 <211> 33
 55 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 60 <400> 146
 caggcgtecc agtcaattag cagcgtgctc tcc 33

<210> 147
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 147
 ttggcctcca ctctggcctc g 21
 10 <210> 148
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 148
 caaaccaact acggaacctc cagctccaac tacggctttg cc 42
 <210> 149
 20 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 149
 aactatgcaa tgagc 15
 <210> 150
 <211> 48
 30 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 35 <400> 150
 tccattagta ctgggtgtct cgcattctac gcgaactggg caaaaggc 48
 <210> 151
 <211> 39
 <212> ADN
 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 151
 45 aatggtggtg gtagttatat ttctattat ttgacttg 39
 <210> 152
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 152
 caggccagtc agagcattag tagttactta tcc 33
 55 <210> 153
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 60 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"

<400> 153
 tctgcatcca ctctggcate t 21
 <210> 154
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 10 <400> 154
 caaagctatt atgatattgg tactagtact 30
 <210> 155
 <211> 15
 <212> ADN
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 155
 20 aactacgcca tgtec 15
 <210> 156
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 156
 tccatcagca caggcggcct ggccttctac gccaatggg ccaagggc 48
 30 <210> 157
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 157
 aacgggggag gctctacat cttctactac ttegacctg 39
 <210> 158
 40 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 45 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 158
 caggctccc agtccatctc ctctacctg tcc 33
 <210> 159
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 55 <400> 159
 tetgectcca cactggecte c 21
 <210> 160
 <211> 30
 <212> ADN
 60 <213> Secvență artificială
 <220>

<221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 160
 cagtcctact acgacatcgg cacctccacc 30
 5 <210> 161
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 10 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 161
 agctatgcaa tgggc 15
 <210> 162
 15 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 162
 accattaata ttggtggtcg cgtatattac gcgagctggg caaaaggc 48
 <210> 163
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 30 <400> 163
 tattataatg gtggtagtta tgacatc 27
 <210> 164
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 164
 40 caggccagtg agagcattta tcgcgtattg gcc 33
 <210> 165
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 45 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 165
 gatacatcca ctctggcatc t 21
 50 <210> 166
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 55 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 166
 caaggcgggtt attatgctga tagttatggt attgct 36
 <210> 167
 60 <211> 15
 <212> ADN

<213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 5 <400> 167
 tcctacgcta tgggc 15
 <210> 168
 <211> 48
 <212> ADN
 10 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 168
 15 accatcaaca tcggcggcag agtgctactac gcctcctggg ccaagggc 48
 <210> 169
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 20 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 169
 tactacaacg ggggctccta cgatata 27
 25 <210> 170
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 30 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 170
 caggcctcag agtccatcta ccgggtgctg gcc 33
 <210> 171
 35 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 40 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 171
 gacaccagca cactggcctc c 21
 <210> 172
 <211> 36
 45 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 50 <400> 172
 caggcgggct actacgccga ctctacgga atcgct 36
 <210> 173
 <211> 15
 <212> ADN
 55 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 173
 60 agttatgcaa tgatc 15
 <210> 174

<211> 48
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 5 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 174
 accattagta ctggtggtat cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48
 <210> 175
 10 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 15 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 175
 ggggggatag ctgctagtag tgcttattat ctcccgtact actttgactt g 51
 <210> 176
 <211> 39
 20 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 25 <400> 176
 cagtcctccc agtcctgta taacaacaac aacctggcc 39
 <210> 177
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 177
 35 ctggcatcca ctctggcatc t 21
 <210> 178
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 40 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 178
 ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact tttgct 36
 45 <210> 179
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 50 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 179
 tcctacgcta tgate 15
 <210> 180
 55 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 60 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 180

accatctcta ccggcggaat tacctactac gcctcctggg ccaagggc 48
 <210> 181
 <211> 51
 <212> ADN
 5 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 181
 10 ggcggtctag ccgcagctc cgcttactac ctgccctact attcgacct g 51
 <210> 182
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 15 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 182
 cagtctctcc agtcctgtga taacaacaac aacctggcc 39
 20 <210> 183
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 25 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 183
 ctggcctcca cactggcctc t 21
 <210> 184
 30 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 184
 ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc ttgct 36
 <210> 185
 <211> 8
 40 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 45 <400> 185
Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
1 5
 <210> 186
 <211> 8
 <212> PRT
 50 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 186
Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser
 55 **1 5**
 <210> 187
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 187
 Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
 5 1 5 10
 <210> 188
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 188
 Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5
 15 <210> 189
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 189
 Asp Thr Ser
 1
 <210> 190
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 30 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 190
 Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 191
 <211> 8
 35 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 40 <400> 191
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
 1 5
 <210> 192
 <211> 8
 <212> PRT
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 192
 Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
 50 1 5
 <210> 193
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 55 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 193
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 194
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 10 <400> 194
Gln Asp Val Asn Thr Ala
 1 5
 <210> 195
 <211> 3
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 195
Ser Ala Ser
 20 1
 <210> 196
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 196
Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5
 30 <210> 197
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 197
Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
 1 5
 <210> 198
 40 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 45 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 198
Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr
 1 5
 <210> 199
 <211> 20
 50 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 55 <400> 199

	Ala	Arg	Gly	Ile	Gln	His	Gly	Gly	Gly	Asn	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
	1				5					10					15	

Gly Met Asp Leu
20

<210> 200
<211> 6
<212> PRT
5 <213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 200
Gln Ser Ile Ser Ser Val
10 1 5
<210> 201
<211> 3
<212> PRT
<213> Secvență artificială
15 <220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 201
Leu Ala Ser
20 1
<210> 202
<211> 14
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
25 <221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 202
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10
<210> 203
30 <211> 8
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 203
Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
1 5
<210> 204
<211> 7
40 <212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
45 <400> 204
Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr
1 5
<210> 205
<211> 20
<212> PRT
50 <213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

<400> 205
 Ala Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15

Gly Met Asp Leu
 20

<210> 206
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 10 <400> 206
 Gln Ser Ile Ser Ser Val
 1 5

<210> 207
 <211> 3
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 207
 Leu Ala Ser
 20 1

<210> 208
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 208
 Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
 1 5 10

30 <210> 209
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 209
 Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
 1 5

40 <210> 210
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 45 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 210
 Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala
 1 5

50 <210> 211
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă

```

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 211
Gly Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1           5           10           15
5 <210> 212
<211> 6
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
10 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 212
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1           5
15 <210> 213
<211> 3
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
20 <221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 213
Ser Ala Ser
1
25 <210> 214
<211> 10
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
30 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 214
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1           5           10
35 <210> 215
<211> 8
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
40 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 215
Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
1           5
45 <210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
50 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 216
Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala
1           5
55 <210> 217
<211> 15
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"

```

<400> 217
 Ala Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10 15
 <210> 218
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 10 <400> 218
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 219
 <211> 3
 <212> PRT
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 219
 Ser Ala Ser
 20 1
 <210> 220
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 220
 Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
 1 5 10
 30 <210> 221
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 221
 Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 222
 40 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 45 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 222
 Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val
 1 5
 <210> 223
 <211> 11
 50 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 55 <400> 223
 Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
 1 5 10

<210> 224
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 224
 Glu Ser Ile Tyr Arg Val
 1 5
 10 <210> 225
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 225
 Asp Thr Ser
 1
 20 <210> 226
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 226
 Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
 1 5 10
 <210> 227
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 35 <400> 227
 Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 228
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 228
 Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val
 45 1 5
 <210> 229
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 229
 Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
 1 5 10
 55 <210> 230
 <211> 6


```

<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 230
Glu Ser Ile Tyr Arg Val
1 5
<210> 231
<211> 3
10 <212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
15 <400> 231
Asp Thr Ser
1
<210> 232
<211> 12
<212> PRT
20 <213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 232
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
25 1 5 10
<210> 233
<211> 8
<212> PRT
<213> Secvență artificială
30 <220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 233
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
35 1 5
<210> 234
<211> 7
<212> PRT
40 <213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 234
Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr
45 1 5
<210> 235
<211> 19
<212> PRT
<213> Secvență artificială
50 <220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
<400> 235
Ala Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Leu

```

<210> 236
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 236
Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn
 1 5
 10 <210> 237
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 237
Leu Ala Ser
 1
 20 <210> 238
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 238
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
 1 5 10
 <210> 239
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 35 <400> 239
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 240
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 240
Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr
 45 1 5
 <210> 241
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 241
Ala Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr
 1 5 10 15
 55 **Phe Asp Leu**

<210> 242
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 242
Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn
 1 5
 10 <210> 243
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 243
Leu Ala Ser
 1
 20 <210> 244
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 244
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
 1 5 10
 <210> 245
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 35 <400> 245
 ggcttcacct tcagcggcta tggg 24
 <210> 246
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 246
 45 attagtagtg gtgtagtta tacc 24
 <210> 247
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 247
 gcaagacatg gggacgatcc cgcctgggtc gcttat 36
 55 <210> 248
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 248
 5 tcaagtataa gttccaacaa c 21
 <210> 249
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 249
 ggcacatcc 9
 15 <210> 250
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 250
 caacagtgga gtagttaccc gtacatgtac acg 33
 <210> 251
 25 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 30 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 251
 gggtactcat tcaatggcta cacc 24
 <210> 252
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 40 <400> 252
 attactcett acaatgggtgc ttct 24
 <210> 253
 <211> 36
 <212> ADN
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 253
 50 gcaagggggg gttacgacgg gaggggtttt gactac 36
 <210> 254
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 55 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 254
 tcaagtgtaa gttac 15
 60 <210> 255
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 255
 gacacatcc 9
 <210> 256
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 15 <400> 256
 cagcagtgga gtaagcacc tctcacg 27
 <210> 257
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 257
 25 ggaatctccc tcagtagcga tgca 24
 <210> 258
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 30 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 258
 attaatggtg gtggtaacac a 21
 35 <210> 259
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 40 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 259
 gccagaggca ttcaacatgg tgggtgtaat agtgattatt attattacgg catggacctc 60
 <210> 260
 45 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 50 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 260
 cagagcatta gtagtgtc 18
 <210> 261
 <211> 9
 55 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 60 <400> 261
 ctggcatct 9

<210> 262
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 262
 caaaccaatt atgtactag tagtagtaat tatggtttg ct 42
 10 <210> 263
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 263
 ggaatttccc tctctccga cgcg 24
 <210> 264
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 264
 atcaacggcg gcggaaacac c 21
 <210> 265
 <211> 60
 30 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 35 <400> 265
 gcgcgcggca tccagcacgg tgggtgaaac agcgactact actactatgg gatggatctg 60
 <210> 266
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 266
 45 cagtcaatta gcagcgtg 18
 <210> 267
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 267
 ttggcctcc 9
 55 <210> 268
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 60 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"

<400> 268
 caaaccaact acggaacctc cagctccaac tacggctttg cc 42
 <210> 269
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 10 <400> 269
 ggattctccc tcaataacta tgca 24
 <210> 270
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 270
 20 attagtactg gtggtctegc a 21
 <210> 271
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 271
 ggcagaaatg gtggtggtag ttatatttc tattatttg acttg 45
 30 <210> 272
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 35 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 272
 cagagcatta gtagttac 18
 <210> 273
 40 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 45 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 273
 tetgcatcc 9
 <210> 274
 <211> 30
 50 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 55 <400> 274
 caaagctatt atgatattgg tactagtact 30
 <210> 275
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secvență artificială
 <220>

```

<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
<400> 275
ggtttctccc tgaacaacta cgcc 24
5  <210> 276
   <211> 21
   <212> ADN
   <213> Secvență artificială
   <220>
10 <221> sursă
   <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
   <400> 276
   atcagcacag gcggcctggc c 21
   <210> 277
15 <211> 45
   <212> ADN
   <213> Secvență artificială
   <220>
   <221> sursă
20 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
   <400> 277
   gccagaaacg gcggaggctc ctacatcttc tactacttcg acctg 45
   <210> 278
   <211> 18
25 <212> ADN
   <213> Secvență artificială
   <220>
   <221> sursă
   <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
30 <400> 278
   cagtccatct cctctac 18
   <210> 279
   <211> 9
   <212> ADN
35 <213> Secvență artificială
   <220>
   <221> sursă
   <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
   <400> 279
40 tctgcctcc 9
   <210> 280
   <400> 280
   000
   <210> 281
45 <400> 281
   000
   <210> 282
   <400> 282
   000
50 <210> 283
   <400> 283
   000
   <210> 284
   <400> 284
55 000
   <210> 285
   <400> 285
   000
   <210> 286
60 <400> 286
   000

```


<210> 287
 <400> 287
 000
 <210> 288
 5 <400> 288
 000
 <210> 289
 <400> 289
 000
 10 <210> 290
 <400> 290
 000
 <210> 291
 <400> 291
 15 000
 <210> 292
 <400> 292
 000
 <210> 293
 20 <400> 293
 000
 <210> 294
 <400> 294
 000
 25 <210> 295
 <400> 295
 000
 <210> 296
 <400> 296
 30 000
 <210> 297
 <400> 297
 000
 <210> 298
 35 <400> 298
 000
 <210> 299
 <400> 299
 000
 40 <210> 300
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 45 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 300
 cagtcctact acgacatcgg cacctccacc 30
 <210> 301
 50 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 55 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 301
 ggaatcgacc tcagtagcta tgca 24
 <210> 302
 <211> 21
 60 <212> ADN
 <213> Secvență artificială

<220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 302
 5 attaatattg gtggtcgcgt a 21
 <210> 303
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 10 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 303
 gccagatatt ataatggtgg tagttatgac atc 33
 15 <210> 304
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 20 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 304
 gagagcattt atcgcgta 18
 <210> 305
 25 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 30 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 305
 gatacatcc 9
 <210> 306
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 40 <400> 306
 caaggcgggtt attatgctga tagttatggt attgct 36
 <210> 307
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 307
 50 ggaatcgacc tgtctccta cgct 24
 <210> 308
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 55 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 308
 atcaacatcg ggggcagagt g 21
 60 <210> 309
 <211> 33

<212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 5 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 309
 gcccggtact acaacggcgg ctcctacgat atc 33
 <210> 310
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 15 <400> 310
 gagtccatct accgggtg 18
 <210> 311
 <211> 9
 <212> ADN
 20 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 311
 25 gacaccagc 9
 <210> 312
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 30 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 312
 caggcgggct actacgccga ctcctacgga atcgct 36
 35 <210> 313
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 40 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 313
 ggattctccc tcagtagtta tgca 24
 <210> 314
 45 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 50 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 314
 attagtactg gtggtatcac a 21
 <210> 315
 <211> 57
 55 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 60 <400> 315
 gccagagggg gatagtctgc tagtagtget tattatctcc cgtactactt tgaattg 57

<210> 316
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 316
 cagagtgttt ataataataa caac 24
 10 <210> 317
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 317
 ctggcatcc 9
 <210> 318
 20 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 25 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 318
 ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact ttgct 36
 <210> 319
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 35 <400> 319
 ggcttctccc tgctctecta cgct 24
 <210> 320
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 320
 45 atctctaccg gcggaattac c 21
 <210> 321
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 50 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 321
 gctagaggcg gctacgcgc cagctccgct tactacctgc cctactact cgacctg 57
 55 <210> 322
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 60 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"

<400> 322
 cagtcctgtg ataacaacaa caac 24
 <210> 323
 <211> 9
 5 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 10 <400> 323
 ctggcctcc 9
 <210> 324
 <211> 36
 <212> ADN
 15 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Oligonucleotidă sintetică"
 <400> 324
 20 ctgggcggct ggcagcagca cgccgatacc ttgct 36
 <210> 325
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 25 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 325
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

 Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Ser Gly
 100 105 110

 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

250

```

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130                      135                      140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                      150                      155                      160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                      165                      170                      175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
                      180                      185                      190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195                      200                      205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210                      215                      220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                      230                      235                      240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                      245                      250                      255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                      260                      265                      270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275                      280                      285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290                      295                      300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                      310                      315                      320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                      325                      330                      335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                      340                      345                      350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
                      355                      360                      365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

```

251

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys
<210> 326
<211> 213
<212> PRT
5 <213> Secvență artificială
<220>
<221> sursă
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
<400> 326
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

10 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 327

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 327

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

10 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

253

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165					170					175	

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 328

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 328

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

255

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 329

<211> 453

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 329

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
20 25 30

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

10 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

```

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile
      85                      90                      95

Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
      100                      105                      110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
      115                      120                      125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
      130                      135                      140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
      145                      150                      155                      160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
      165                      170                      175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
      180                      185                      190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
      195                      200                      205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
      210                      215                      220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
      225                      230                      235                      240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
      245                      250                      255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
      260                      265                      270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
      275                      280                      285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
      290                      295                      300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
      305                      310                      315                      320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
      325                      330                      335

```

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 330

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 330

Glu Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

10 Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

258

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 331

<211> 456

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 331

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

10

Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	His	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	65	70	75	80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Arg	Gly	Ile	Gln	His	Gly	Gly	Gly	Asn	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	100	105	110	
Met	Asp	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	115	120	125	
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	130	135	140	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	145	150	155	160
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	165	170	175	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	180	185	190	
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	195	200	205	
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	210	215	220	
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	225	230	235	240
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	245	250	255	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	260	265	270	
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	275	280	285	
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	290	295	300	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	305	310	315	320

260

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 332

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 332

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

10

261

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 333

<211> 448

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 333

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

10

```

Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 50                               55                               60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65                               70                               75                               80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Gly
                               85                               90                               95

Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
                               100                               105                               110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115                               120                               125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130                               135                               140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                               150                               155                               160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                               165                               170                               175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180                               185                               190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195                               200                               205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210                               215                               220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                               230                               235                               240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                               245                               250                               255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260                               265                               270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275                               280                               285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

```

290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 334
 <211> 215
 <212> PRT
 5 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"
 <400> 334
 Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Ile Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 10 Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly

264

50		55		60	
Ser 65	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu 70
					Tyr
					Thr
					Leu
					Thr
					Ile 75
					Ser
					Asp
					Leu
					Glu
					Cys 80
Ala	Asp	Ala	Ala	Thr 85	Tyr
					Phe
					Cys
					Gln
					Ser 90
					Tyr
					Tyr
					Asp
					Ile
					Gly 95
					Thr
Ser	Thr	Phe	Gly 100	Gly	Gly
					Thr
					Glu
					Val 105
					Val
					Val
					Lys
					Arg
					Thr 110
					Val
					Ala
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile
					Phe
					Pro
					Pro
					Ser
					Asp
					Glu
					Gln 125
					Leu
					Lys
					Ser
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val
					Cys
					Leu
					Leu
					Asn
					Asn
					Phe
					Tyr
					Pro
					Arg
					Glu
					130
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys
					Val
					Asp
					Asn
					Ala
					Leu
					Gln
					Ser
					Gly
					Asn
					Ser
					160
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
					Gln
					Asp
					Ser
					Lys
					Asp
					Ser
					Thr
					Tyr
					Ser
					Leu
					175
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu
					Ser
					Lys
					Ala
					Asp
					Tyr
					Glu
					Lys
					His
					Lys
					Val
					180
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr
					His
					Gln
					Gly
					Leu
					Ser

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

265

35	40	45
Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys 50 55 60		
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu 65 70 75 80		
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95		
Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly 100 105 110		
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser 115 120 125		
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala 130 135 140		
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val 145 150 155 160		
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala 165 170 175		
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val 180 185 190		
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His 195 200 205		
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys 210 215 220		
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 225 230 235 240		
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 245 250 255		
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 260 265 270		
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 275 280 285		

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 336

<211> 215

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 336

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 337

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 337

10 Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

```

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
    20                      25                      30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
    35                      40                      45

Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
    50                      55                      60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ala Pro
    65                      70                      75                      80

Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr
    85                      90                      95

Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
    100                     105                     110

Ser Leu Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
    115                     120                     125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
    130                     135                     140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
    145                     150                     155                     160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
    165                     170                     175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    180                     185                     190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
    195                     200                     205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    210                     215                     220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
    225                     230                     235                     240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
    245                     250                     255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
    260                     265                     270

```


Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 338

<211> 217

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 338

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

10

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

270

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
85 90 95

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 339

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 339

10 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
    20                      25                      30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
    35                      40                      45

Gly Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
    50                      55                      60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
    65                      70                      75                      80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
    85                      90                      95

Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
   100                      105                      110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
   115                      120                      125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
   130                      135                      140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
   145                      150                      155                      160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
   165                      170                      175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
   180                      185                      190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
   195                      200                      205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
   210                      215                      220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
   225                      230                      235                      240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
   245                      250                      255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
   260                      265                      270

```

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 340

<211> 217

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 340

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

10

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
 65 70 75 80
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
 85 90 95
 Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 115 120 125
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 145 150 155 160
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 180 185 190
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 341

<211> 452

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 341

10 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Ser
 1 5 10 15

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

274

Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ala
20															
Met	Ile	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
35															
Thr	Ile	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	Gly
50															
Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Ile	Thr
65															
Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly	Gly
85															
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp
100															
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
115															
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
130															
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145															
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
165															
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
180															
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
195															
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
210															
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225															
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
245															
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

275

260

265

270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 342

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 342

10 Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

276

1	5	10	15
Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn	20	25	30
Asn Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu	35	40	45
Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val	65	70	75
Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp	85	90	95
Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys	100	105	110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	115	120	125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	130	135	140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	145	150	155
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	195	200	205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 343

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 343

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

277

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Ala	Met	Ile	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Thr	Ile	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	50	55	60	
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	65	70	75	80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Arg	Gly	Gly	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Phe	100	105	110	
Asp	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	115	120	125	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	130	135	140	
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	145	150	155	160
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	165	170	175	
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	180	185	190	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	195	200	205	
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	210	215	220	
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 344

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polipeptidă sintetică"

<400> 344

MD/EP 3423105 T2 2021.10.31

279

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
          20          25          30

Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
          35          40          45

Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50          55          60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65          70          75          80

Gln Cys Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
          85          90          95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
          115          120          125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130          135          140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145          150          155          160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
          180          185          190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195          200          205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210          215

```

<210> 345

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

<400> 345

gaggtccaac	tggtggagag	cggtggaggt	gttgtgcaac	ctggccggtc	cctgcgcctg	60
tcctgctccg	catctggctt	caccttcagc	ggctatgggt	tgtcttgggt	gagacaggca	120
cctggaaaag	gtcttgagtg	ggttgcaatg	attagtagtg	gtggtagtta	tacctactat	180
gcagacagtg	tgaagggtag	atttgcaata	tcgcgagaca	acgccaaagaa	cacattgttc	240
ctgcaaatgg	acagcctgag	acccgaagac	accgggggtct	atTTTTgtgc	aagacatggg	300
gacgatcccg	cctggttcgc	ttattggggc	caaggggaccc	cggtcacccg	ctcctcagcc	360
tccaccaagg	gcccatcggg	cttccccctg	gcacctcctc	ccaagagcac	ctctgggggc	420
acagcggccc	tgggctgcct	ggtcaaggac	tacttccccg	aaccggtgac	ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg	ccctgaccag	cggcgtgcac	accttccccg	ctgtcctaca	gtcctcagga	540
ctctactccc	tcagcagcgt	ggtgaccgtg	ccctccagca	gcttggggac	ccagacctac	600
atctgcaacg	tgaatcacia	gccagcaaac	accaagggtg	acaagaaagt	tgagcccaaa	660
tcttgtgaca	aaactcacac	atgccaccgc	tgccagcac	ctgaactcct	ggggggaccg	720
tcagtcttcc	tcttcccccc	aaaacccaag	gacacctca	tgatctcccc	gacctctgag	780
gtcacatgcg	tggtggtgga	cgtgagccac	gaagaccctg	aggtcaagtt	caactggtac	840
gtggacggcg	tggaggtgca	taatgccaa	acaaagccgc	gggaggagca	gtacaacagc	900
acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcacccgc	ctgcaccagg	actggctgaa	tggcaaggag	960
tacaagtgca	aggtctccaa	caaagccctc	ccagccccca	togagaaaac	catctccaaa	1020
gccaaagggc	agccccgaga	accacagggt	tacacctgc	ccccatcccc	ggatgagctg	1080
accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctatcccag	cgacatcgcc	1140
gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	tcccgtgctg	1200
gactccgacg	gtccttcttt	cttatattca	aagctcaccg	tggacaagag	caggtggcag	1260
caggggaacg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgcacaacca	ctacacgcag	1320
aagagcctct	ccctgtctcc	cgggaaatga				1350

<210> 346

<211> 654

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

<400> 346

	gacatccagc tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc	60
	atcacctgta gtgtcagctc aagtataagt tccaacaact tgcaactgta ccagcagaag	120
	ccaggtaagg ctccaaagcc atggatctac ggacacatcca acctggcttc tgggtgcca	180
	agcagattca gcggtagcgg tagcgggtacc gactacacct tcaccatcag cagcctocag	240
	ccagaggaca tgcgcaccta ctactgccaa cagtggagta gttaccgta catgtacacg	300
	ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac	360
	ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat	420
	aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tgggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt	480
	aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc	540
	accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtccac	600
	catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttaa	654
	<210> 347	
	<211> 1350	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 347	
	caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata	60
	tcctgcaagg cttctggtta ctcatcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc	120
	catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatggtgc ttctagctac	180
	aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac	240
	atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aagggggggt	300
	tacgacggga ggggttttga ctactgggga tccgggaccc cggtcaccgt ctctcagcc	360
	tccaccaagg gcccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
	acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
	aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga	540
	ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
	atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagccaaa	660
	tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
10	tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccc gacctctgag	780

	gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	840
	gtggacggcg tggagggtgca taatgccaaag acaaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
	tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc togagaaaac catctccaaa	1020
	gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg	1080
	accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1140
	gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1200
	gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag	1260
	caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
	aagagcctct ccctgtctcc cgggaaatga	1350
	<210> 348	
	<211> 642	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 348	
	gacatcgagc tcaactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
	atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc	120
	acctccccc aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccaggtcgc	180
	ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacia tcagcagcgt ggaggtgaa	240
	gatgatgcaa cttattactg ccagcagtg agtaagcacc ctctcacgtt cggatccggg	300
	accaagggtg aaatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct	360
	gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc	420
	agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag	480
	agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg	540
	agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg	600
10	agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa	642
	<210> 349	
	<211> 1362	
	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
15	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 349	

	cagtcggtgg aggagtcggtg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc	60
	tgcaccgtct ctggaatctc cctcagtagc gatgcaataa gctgggtccg ccaggtcca	120
	gggaaggggc tcgaatacat cggaatcatt aatgggtggtg gtaacacata ctacgcgagc	180
	tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cgggtggatct gaaaatcacc	240
	agtcggacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggcattca acatggtggt	300
	ggtaatagtg attattatta ttacggcatg gacctctggg gcccaggcac cctggtcact	360
	gtctcttcag catccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc	420
	acctctgggg gcacagcggc cctgggtgct ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg	480
	acggtgtcgt ggaactcagg cgccttgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta	540
	cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc	600
	accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa	660
	gttagacca aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaactc	720
	ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc caaaaccca aggacaccct catgatctcc	780
	cggaccctcg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccg tgaggtcaag	840
	ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag	900
	cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg	960
	aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	1020
	accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc	1080
	cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc	1140
	agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	1200
	cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcttatatt caaagctcac cgtggacaag	1260
	agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac	1320
	cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cccgggaaat ga	1362
	<210> 350	
	<211> 660	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 350	
10	gaagtgttga tgaccagac tccatcctcc gtgtctgcag ctgtgggaga cacagtcacc	60

	atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agtgtottgt cctgggtatca gcagaaacca	120
	gggcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatcg	180
	cggttcagcg gcagtagatc tgggacagag ttactctca ccatcagcga cctggagtgt	240
	gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaacc aattatggta ctagtagtag taattatggt	300
	tttgctttcg gcgaggggac cgaggtggtc gtcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc	360
	ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg	420
	ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa	480
	tccggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
	agcagcacc ctagcgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa	600
	gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga	660
	<210> 351	
	<211> 1371	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 351	
	gaagtccaac tgggtgaaaag cgggggagga ctggtgcagc cgggcggatc cctccggctg	60
	tcatgtgctg catcgggaat ttccctctcc tccgacgcga ttagctgggt cagacaggcc	120
	cccgaaaagg ggctggagta catcggatc atcaacggcg gcggaaacac ctactacgcc	180
	tcctgggcca agggccgctt caccatctcg cggcataatt ccaagaacac tctgtacttg	240
	caaatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcgcg cggcatccag	300
	cacggtgggtg gaaacagcga ctactactac tatgggatgg atctgtgggg ccagggaact	360
	cttgtgaccg tgtcgtcagc atccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc	420
	tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc	480
	gaaccgggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gggcgtgca cacttcccg	540
	gctgtcctac agtctcagg actctactcc ctacgcagcg tggtgaccgt gccctccagc	600
	agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg	660
	gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgccacc gtgccagca	720
	cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc	780
	atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgggtg acgtgagcca cgaagaccct	840
	gaggtcaagt tcaactggtc cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg	900
10	cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag	960
	gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagcccc	1020
	atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg	1080
	ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc	1140
	ttctatccca gcgacatcg cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac	1200
	aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcttatattc aaagctcacc	1260
	gtggacaaga gcagggtggc gcagggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct	1320
	ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggaaatg a	1371

<210> 352
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 5 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 352
 gacattcaga tgacccagtc cccaagctcg ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60
 atcacgtgcc aggcgctcca gtcaattagc agcgtgctct cctggtagca acagaagccg 120
 gggaaagcac ccaagctgct gatctacttg gcctccactc tggcctcggg agtgccttca 180
 cgggtctccg gatcgggatc tgggtactgat ttcacctca ccatctcgag ccttcagtgc 240
 gaggacatcg ctacttacta ttgtcaaacc aactacggaa cctccagctc caactacggc 300
 tttgccttcg gtggcgggac caaggtcgaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcattcttc cgcctctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgcctccaa 480
 tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagctc 540
 agcagcacc tgacgctgag caagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgcgc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660
 10 <210> 353
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 15 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"
 <400> 353
 cagtcgggtgg aggagtcggg gggtcgctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

	tgcacagtct ctggattctc cctcaataac tatgcaatga gctgggtccg ccaggtcca	120
	gggaaggggc tggaatggat cggatccatt agtactggtg gtctcgcatc ctacgcgaac	180
	tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cgggtgatct gaaaatgacc	240
	agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtggca gaaatggtgg tggtagttat	300
	attttctatt attttgactt gtggggccaa ggcacctcg tcaactgtctc ttcagcatcc	360
	accaagggcc catcggctct cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca	420
	gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	480
	tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctcaggactc	540
	tactccctca gcagcgtggt gacctgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc	600
	tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaactc	660
	tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	720
	gtcttctctc tcccccaaa acccaaggac acctcatga tctcccgac ccctgaggtc	780
	acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	840
	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg	900
	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	960
	aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	1020
	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	1080
	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1140
	gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1200
	tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctacacgtgg acaagagcag gtggcagcag	1260
	gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcac gaggtctgc acaaccacta caccgagaag	1320
	agcctctccc tgtctcccg gaaatga	1347
	<210> 354	
	<211> 648	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 354	
	gcattcgaat tgaccagac tccatcctcc gtggaggcag ctgtgggagg cacaatcacc	60
	atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agttacttat cctgggtatca gcagaaacca	120
	gggcagcctc ccaagctcct gatctattct gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg	180
10	cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcga cctggagtg	240

	gccgatgctg ccacttactt ctgtcaaagc tattatgata ttggtactag tactttcggc	300
	ggaggggaccg aggtgggtcgt caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
	ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
	tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc	480
	caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg	540
	acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
	ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggtga	648
	<210> 355	
	<211> 1356	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 355	
	gaagtgcagc tgggtggaatc tggcgccgga ctgggtgcagc ctggcggtac tctgagactg	60
	tcttgtgccg cctccggctt ctccctgaac aactacgcca tgtcctgggt gcgacaggcc	120
	cctggcaaag gcctggaatg gatcggtcc atcagcacag gcggcctggc cttctacgcc	180
	aattgggcca agggccggtt caccatcagc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctc	240
	cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aaacggcgga	300
	ggctcctaca tcttctacta cttcgacctg tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtca	360
	tctgcatcca ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct	420
	gggggcacag cgccctggg ctgcctggtc aaggactact tcccgaacc ggtgacggtg	480
	tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc	540
	tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag	600
	acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag	660
	cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	720
	ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	780
	cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840
	tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac	900
	aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
	aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1020
10	tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat	1080
	gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcagc	1140
	atgcgcgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
	gtgctggact ccgacggctc cttcttctta tattcaaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
	tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1320
	acgcagaaga gcctctccct gtctcccgga aaatga	1356
	<210> 356	
	<211> 648	
15	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	

	<220>		
	<221> sursă		
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"		
	<400> 356		
	gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtggggcca cagagtgacc	60	
	atcacctgtc aggcctccca gtccatctcc tctacactgt cctgggtatca gcagaagccc	120	
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctactct gcctccacac tggcctcagg cgtgccctct	180	
	agattctccg gctctggctc tggcacccagc ttaccctga ccatcagetc cctccagtgc	240	
	gaggatgccg ccacctacta ctgccagtcc tactacgaca tcggcacctc caccttcggc	300	
	ggaggcacca aggtggaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc	360	
	ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420	
	tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc	480	
	caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcact acagcctcag cagcacctg	540	
	acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600	
5	ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttga	648	
	<210> 357		
	<211> 1335		
	<212> ADN		
	<213> Secvență artificială		
10	<220>		
	<221> sursă		
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"		
	<400> 357		
	cagtcagtga aggagtcagg gggctgcctg gtcacgcctg ggacaccctt gacactcacc	60	
	tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc tatgcaatgg gctgggtccg ccaggctcca	120	
	gggaaggggc tggaatacat cggaaccatt aatattgggtg gtcgcgtata ttacgcgagc	180	
	tgggcaaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cgggtggatct gaaagcggcc	240	
15			

	agtctgacag ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcc a gatattataa tgggtgtagt	300
	tatgacatct gggggccagg caccctggtc accgtctctt tagcatccac caagggccca	360
	tcggtcttcc ccctggcacc ctccctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc	420
	tgcctggtca aggactactt ccccgaaaccg gtgacgggtg cgtggaactc aggcgcctg	480
	accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc	540
	agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcaaccaga cctacatctg caacgtgaat	600
	cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact	660
	cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctccctgggg gaccgtcagt ctccctcttc	720
	ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaacc ctgaggtcac atgcgtggtg	780
	gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag	840
	gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc	900
	agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc	960
	tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc	1020
	cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc	1080
	agcctgacct gcctggtcaa aggtctctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc	1140
	aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc	1200
	ttcttcttat attcaaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc	1260
	tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg	1320
	tctcccgga aatga	1335
	<210> 358	
	<211> 654	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 358	
	gatgttgtga tgaccagac tccagcctcc gcgtctgaac ctgtgggagg cacagtcacc	60
	atcaagtgcc aggcagtgag gagcatttat cgcgtattgg cctggatatca gcagaaacca	120
	gggcagcctc ccaagctcct gatctatgat acatccactc tggcatctgg ggccccatcg	180
	cggttcaaag gcagtggata tgggacagag ttactctca ccatcagcgg cgtgcagtgt	240
	gaagatgctg ccaactacta ctgtcaaggc ggttattatg ctgatagtta tggatttgct	300
10	ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac	360
	ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat	420
	aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaagggtg ataacgcctt ccaatcgggt	480
	aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc	540
	accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc	600
	catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag agcttcaaca ggggagagtg ttga	654
	<210> 359	
	<211> 1344	
15	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	

<220>	
<221> sursă	
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
<400> 359	
	caggtgcagc tgggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60
	tctctgttccg cctccggaat cgacctgtcc tctacgcta tgggctgggt gcgacaggct 120
	cctggcaagg gcctggagta catcggcacc atcaacatcg gcggcagagt gtactacgcc 180
	tctctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240
	cagatgaact cctcgccggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtactacaac 300
	ggcggctcct acgatattctg gggccagggc aactcgtga ccgtgtctc tgcattccacc 360
	aagggcccat cggctcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
	gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
	ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac 540
	tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacattctgc 600
	aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
	gacaaaactc acacatgcc accgtgccc gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc 720
	ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
	tgctggtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 840
	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
	tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1020
	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080
	aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag 1140
	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
5	gacggctcct tcttcttata ttcaaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1260
	aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
	ctctccctgt ctcccgggaa atga 1344
<210> 360	
<211> 654	
10	<212> ADN
	<213> Secvență artificială
<220>	
<221> sursă	
<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
15	<400> 360

	gatataccaga tgacccagtc cccctccacc ctgtctgcct ctgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc aggcctccga gtccatctac cgggtgctgg cctggtatca gcagaagcct	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac accagcacac tggcctccgg cgtgccctct	180
	agattctccg gctctggctc tggcacccag tttaccctga ccatctccag cctccagtgc	240
	gacgacgccg ccacctacta ttgtcagggc ggtaactacg ccgactccta cggaatcgct	300
	ttcggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac	360
	ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat	420
	aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tgggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt	480
	aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc	540
	accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtccac	600
	catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttga	654
	<210> 361	
	<211> 1359	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 361	
	cagtcgggtgg aggagtccgg cggctgcctg gtaaagcctg acgaatccct gacactcacc	60
	tgcacagcct ctggattctc cctcagtagt tatgcaatga tetgggtccg ccaggetcca	120
	ggggaggggc tggaatggat cggaaccatt agtactgggt gtatcacata ctacgcgagc	180
	tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cgggtggatct gaaaatcacc	240
	agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgccg gagggggata tgctgctagt	300
10	agtgccttatt atctcccgtg ctactttgac ttgtggggcc aagggaacct ggtcacogtc	360

	tcctcagcat ccaccaaggc cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc	420
	tctgggggca caggggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	480
	gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag	540
	tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc	600
	cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt	660
	gagcccaaact cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg	720
	gggggagcgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg	780
	accctcgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	840
	aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	900
	tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctacccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	960
	ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	1020
	atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg	1080
	gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	1140
	gacatgcgcg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	1200
	cccgctctgg actccgacgg ctccctcttc ttatatcaa agctcacctg ggacaagagc	1260
	aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	1320
	tacacgcaga agagcctctc cctgtctccc gggaaatga	1359
	<210> 362	
	<211> 660	
	<212> ADN	
5	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
	<400> 362	
	gcagccgtgc tgaccagac accatcacc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc	60
	atcagttgcc agtcagtc gagtgtttat aataataaca acttagcctg gtttcagcag	120
	aaaccgggc agcctcccaa gcttctgatc tatctggcat ccaactctggc atctggggtc	180
	ccatcacggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcggcgtg	240
	cagtgtgacg atgctgccac ttattactgt ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact	300
	tttgctttcg gcggaggac tgaggtggtg gtcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc	360
	ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
	ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa	480
10	tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagctc	540
	agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa	600
	gtcacccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga	660
	<210> 363	
	<211> 1368	
15	<212> ADN	
	<213> Secvență artificială	
	<220>	
	<221> sursă	
	<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"	
20	<400> 363	


```

gaagtgcagc tgggtggaatc tggcgggcgga ctggtgcagc ctggcggtac tctgagactg      60
tcttgtgccg cctccggctt ctccctgtcc tcctacgcta tgatctgggt ggcacaggcc      120
cctggcaagg gcctggaatg gatcggcacc atctctaccg gcggaattac ctactacgcc      180
tcctggggcca agggccgggt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc      240
cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgctag aggcggctac      300
gccgccagct ccgcttacta cctgccctac tacttcgacc tgtggggcca gggcacccctc      360
gtgacagtgt catctgcac caccaagggc ccacgggtct tccccctggc accctcctcc      420
aagagcacct ctggggggcac agcgccctg ggcctgcctg tcaaggacta cttccccgaa      480
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt      540
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc      600
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac      660
aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct      720
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg      780
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag      840
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaaagc aaagccgcgg      900
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac      960
tggtggaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc      1020
gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag ccccgagaa cagaggtgta caccctgcc      1080
ccatccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc      1140
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag      1200
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttct tatattcaaa gctcacctg      1260
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg      1320
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctcccg ggaaatga      1368

```

<210> 364

<211> 660

<212> ADN

5 <213> Secvență artificială

<220>

<221> sursă

<223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Polinucleotidă sintetică"

<400> 364

gatattcaga tgaccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggoga cagagtgacc 60
 atcacctgtc agtcctccca gtccgtgtat aacaacaaca acctggcctg gtatcagcag 120
 aaacccggca aggtgccccaa gctgctgata tacctggcct ccacactggc ctctggcgtg 180
 cccctctagat tctccggctc tggctctggc accgaactta ccccgacct cagctccctc 240
 cagtgcgagg atgccgccac ctactattgc ctggggcggct ggcagcagca cgcgcatacc 300
 tttgcttttg gcggaggcac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgcctccaa 480
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
 gtcaccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660
 <210> 365
 <211> 4
 <212> PRT
 5 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 365
 Ala His Lys Asp
 10 1
 <210> 366
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 15 <220>
 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 366
 Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu
 1 5 10
 20 <210> 367
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 25 <221> sursă
 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 367
 Gly Phe Leu Gly
 1
 <210> 368
 30 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursă
 35 <223> /notă="Descrierea secvenței artificiale: Peptidă sintetică"
 <400> 368
 Ala Leu Ala Leu
 1

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- ZHENG W ET AL: "Macrocyclic ketone analogues of halichondrin B", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, AMSTERDAM, NL, vol. 14, no. 22, 15 November 2004 (2004-11-15), pages 5551-5554, XP004598592, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2004.08.069
- WO-A2-2014/089335
- SRIDHAR NARAYAN ET AL: "Novel second generation analogs of eribulin. Part II: Orally available and active against resistant tumors in vivo", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, PERGAMON, AMSTERDAM, NL, vol. 21, no. 6, 20 January 2011 (2011-01-20), pages 1634-1638, XP028169543, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/J.BMCL.2011.01.097 [retrieved on 2011-01-25]
- NIKOLAOS DIAMANTIS ET AL: "Antibody-drug conjugates-an emerging class of cancer treatment", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 114, no. 4, 16 February 2016 (2016-02-16), pages 362-367, XP55371017, GB ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/bjc.2015.435

(57) Revendicări:**1. Conjugat anticorp-medicament cu Formula (I):**

în care

(i) Ab este un anticorp alfa al receptorului anti-folat de internalizare sau fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 2 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 3 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 4 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 7 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 8 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 9 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 13 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 14 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 15 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 16 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 17 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 18 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT;

(ii) D este eribulină;

(iii) L este un linker care poate fi scindat care cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; și

(iv) *p* este un număr întreg de la 1 până la 8.

2. Conjugat anticorp-medicament conform revendicării 1, în care anticorpul sau fragmentul de legare la antigen cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 23, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 24.

3. Conjugat anticorp-medicament conform revendicării 1 sau revendicării 2, în care *p* este un număr întreg de la 3 la 4.

4. Conjugat anticorp-medicament conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, în care anticorpul sau fragmentul de legare la antigen cuprinde un domeniu constant al lanțului greu de IgG1 umană și un domeniu constant al lanțului ușor kappa de Ig umană.

5. Compoziție care cuprinde mai multe copii ale conjugatului anticorp-medicament conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4, în care *p* mediu al conjugatelor anticorp-medicament în compoziție este de la aproximativ 3,2 până la aproximativ 3,8 sau de la aproximativ 3,6 până la aproximativ 4,4.

6. Conjugat anticorp-medicament conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4 sau compoziție conform revendicării 5 pentru utilizare în tratamentul unui cancer care exprimă receptorul alfa al folatului.

7. Conjugat anticorp-medicament pentru utilizare conform revendicării 6, unde cancerul este un cancer gastric, un cancer ovarian seros, un cancer ovarian cu celule clare, un cancer pulmonar cu celule non-mici, un cancer colorectal, un cancer mamar triplu negativ, un cancer endometrial, un cancer endometrial seros, un carcinoid pulmonar, sau un osteosarcom.

8. Compoziție farmaceutică ce cuprinde conjugatul anticorp-medicament conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4 sau compoziția conform revendicării 5, și un transportor acceptabil din punct de vedere farmaceutic.

9. Metodă pentru producerea conjugatului anticorp-medicament conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4 sau compoziției conform revendicării 5, care cuprinde punerea în reacție a unui anticorp sau a unui fragment de legare la antigen cu un linker care poate fi scindat legat la eribulină în condiții care permit conjugare.

10. Metodă pentru a determina dacă un pacient va răspunde la tratamentul cu conjugatul anticorp-medicament conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4 sau compoziția conform revendicării 5, cuprinzând furnizarea unei probe biologice de la pacient și punerea în contact a probei biologice cu conjugatul anticorp-medicament conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 4 sau compoziția conform revendicării 5.

11. Metodă conform revendicării 10, în care proba biologică este o biopsie tumorală de la un cancer gastric, un cancer ovarian seros, un cancer ovarian cu celule clare, un cancer pulmonar cu celule non-mici, un cancer colorectal, un cancer mamar triplu negativ, un cancer endometrial, un cancer endometrial seros, un carcinoid pulmonar, sau un osteosarcom.

12. Compoziție care cuprinde mai multe copii ale unui conjugat anticorp-medicament cu Formula (I):



in care

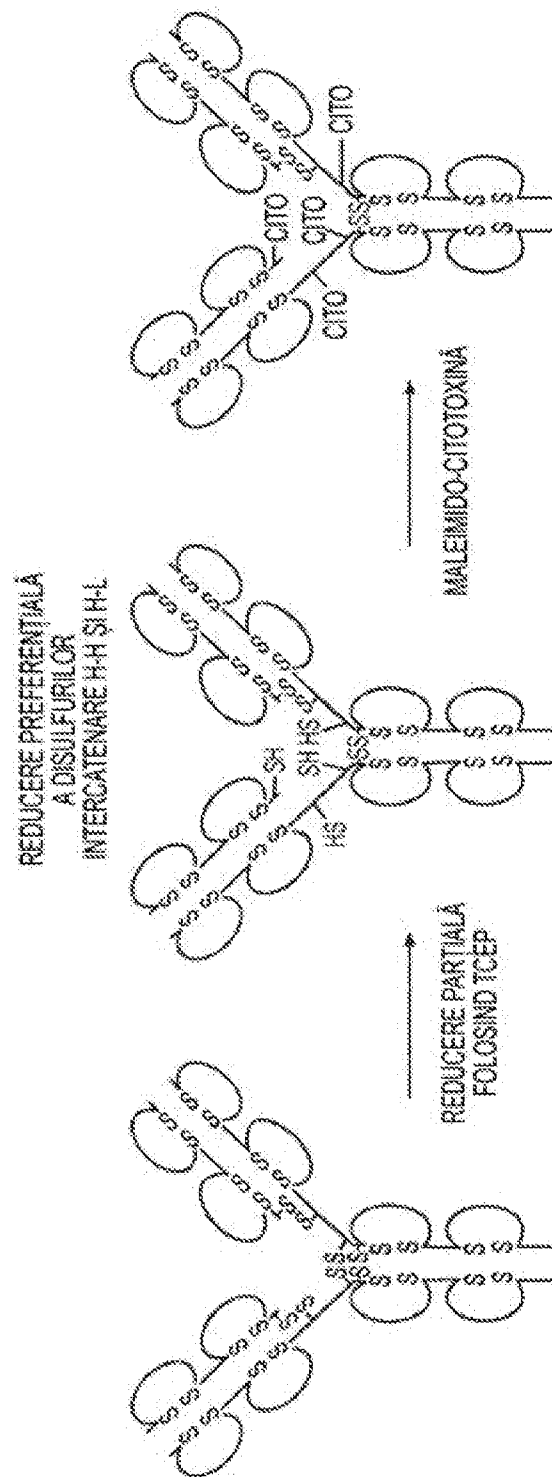
(i) Ab este un anticorp alfa al receptorului anti-folat de internalizare sau fragment de legare la antigen de internalizare al acestuia care cuprinde trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 2 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 3 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 4 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 7 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 8 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 9 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare Kabat; sau trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului greu (HCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 13 (HCDR1), ID. SECV. NR.: 14 (HCDR2), și ID. SECV. NR.: 15 (HCDR3); și trei regiuni de determinare a complementarității ale lanțului ușor (LCDR-uri) cuprinzând secvențele de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 16 (LCDR1), ID. SECV. NR.: 17 (LCDR2), și ID. SECV. NR.: 18 (LCDR3), așa cum este definit de sistemul de numerotare IMGT;

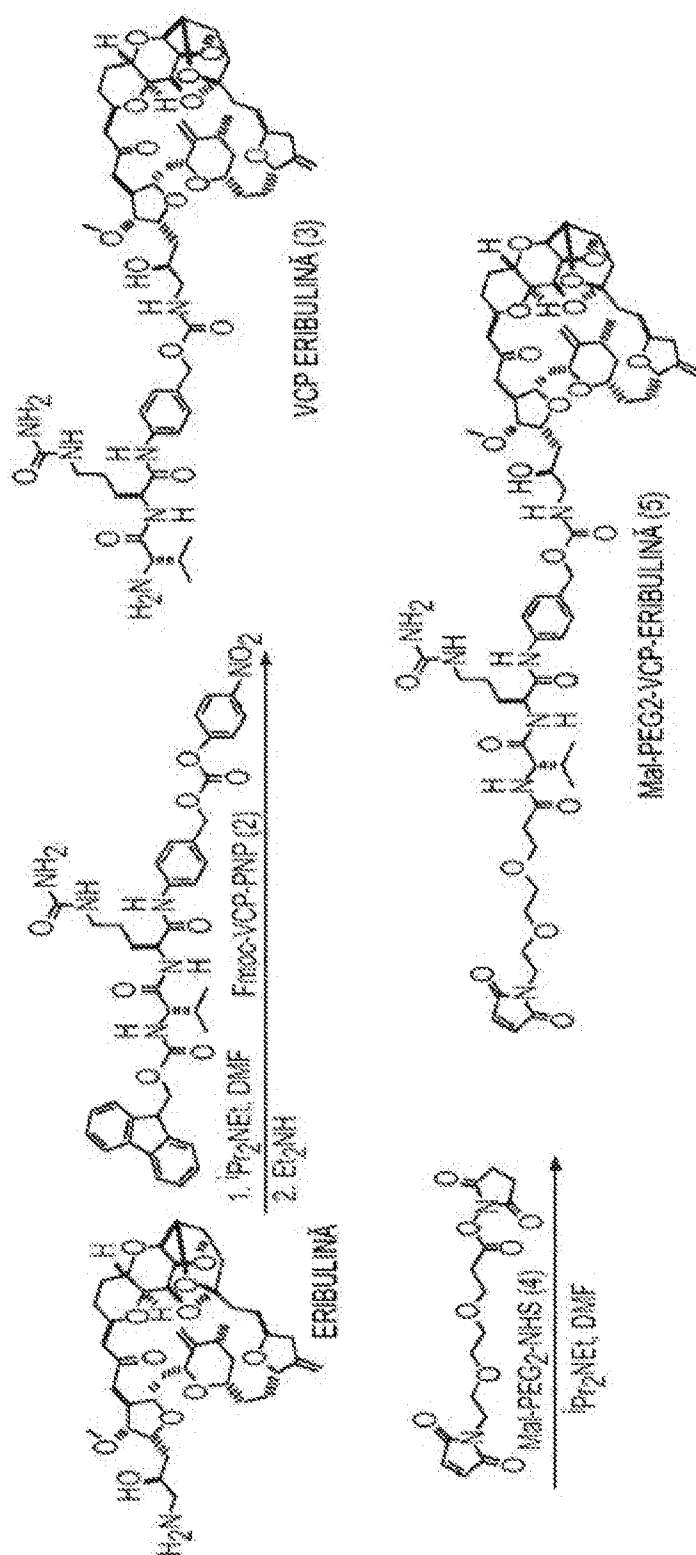
(ii) D este eribulină;

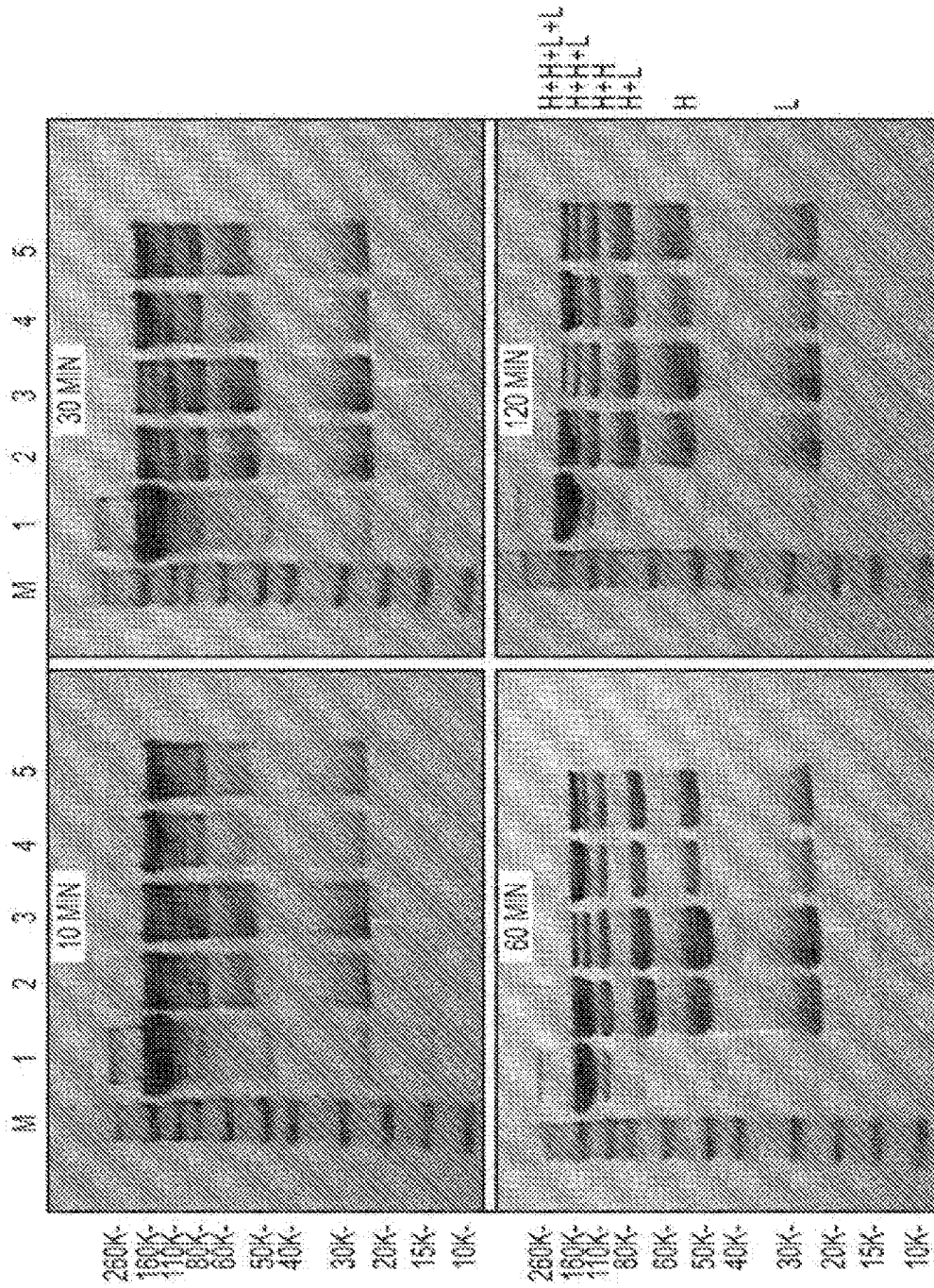
(iii) L este un linker care poate fi scindat care cuprinde Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; și

(iv) p este numărul mediu de porțiuni indivizibile -L-D per Ab, unde p mediu al conjugatelor anticorp-medicament in compoziție este de la aproximativ 3,6 până la aproximativ 4,4.

13. Compoziție conform revendicării 12, în care anticorpul sau fragmentul de legare la antigen cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 23, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi având ID. SECV. NR.: 24.

**FIG. 1**

**FIG. 2**

**FIG. 3**

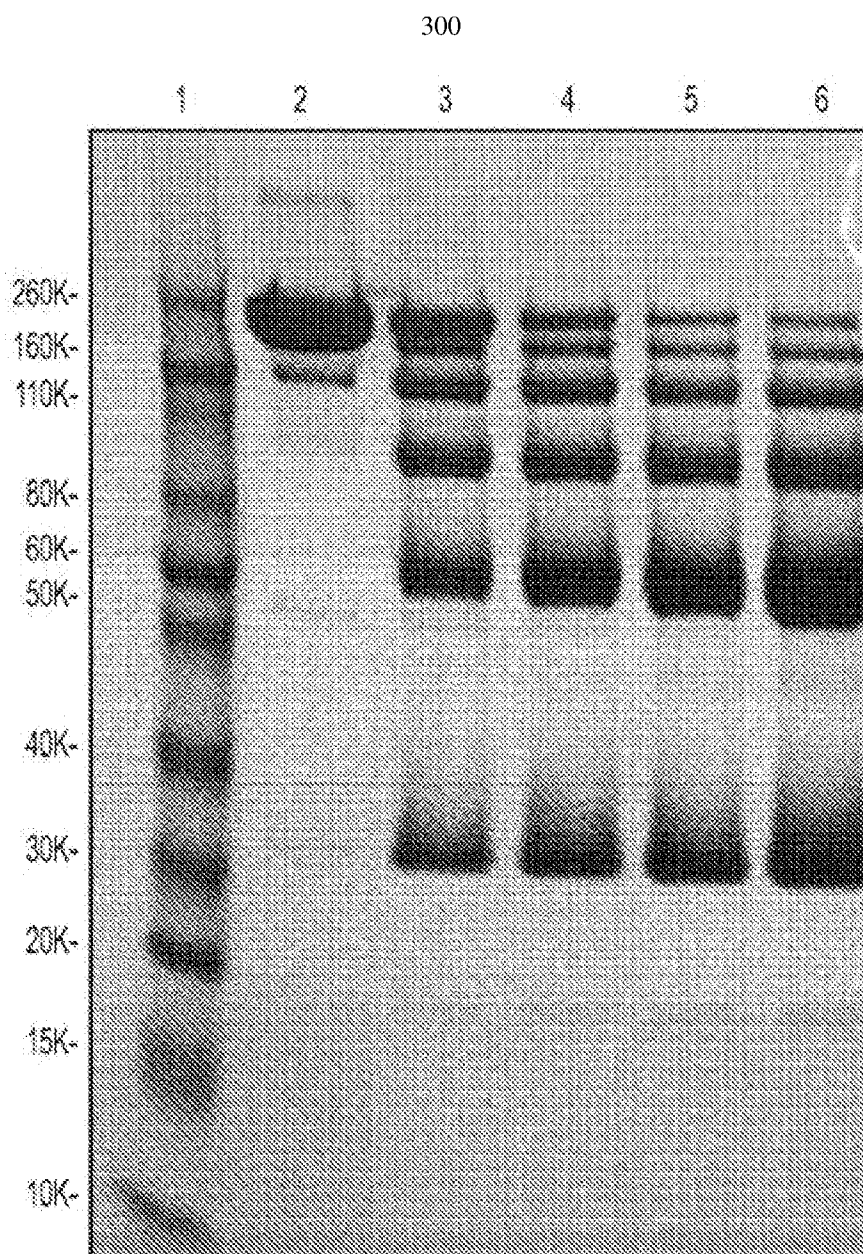
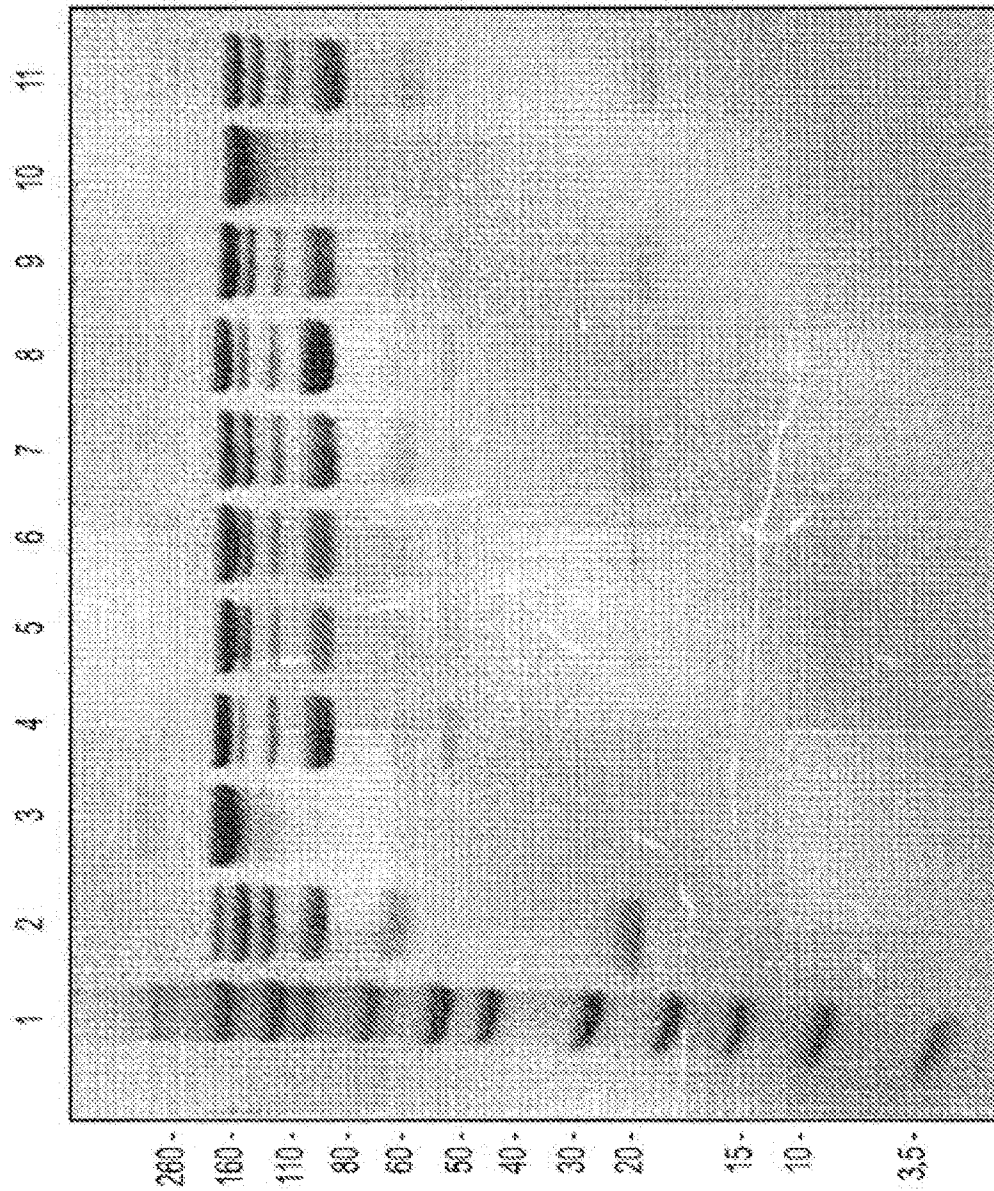
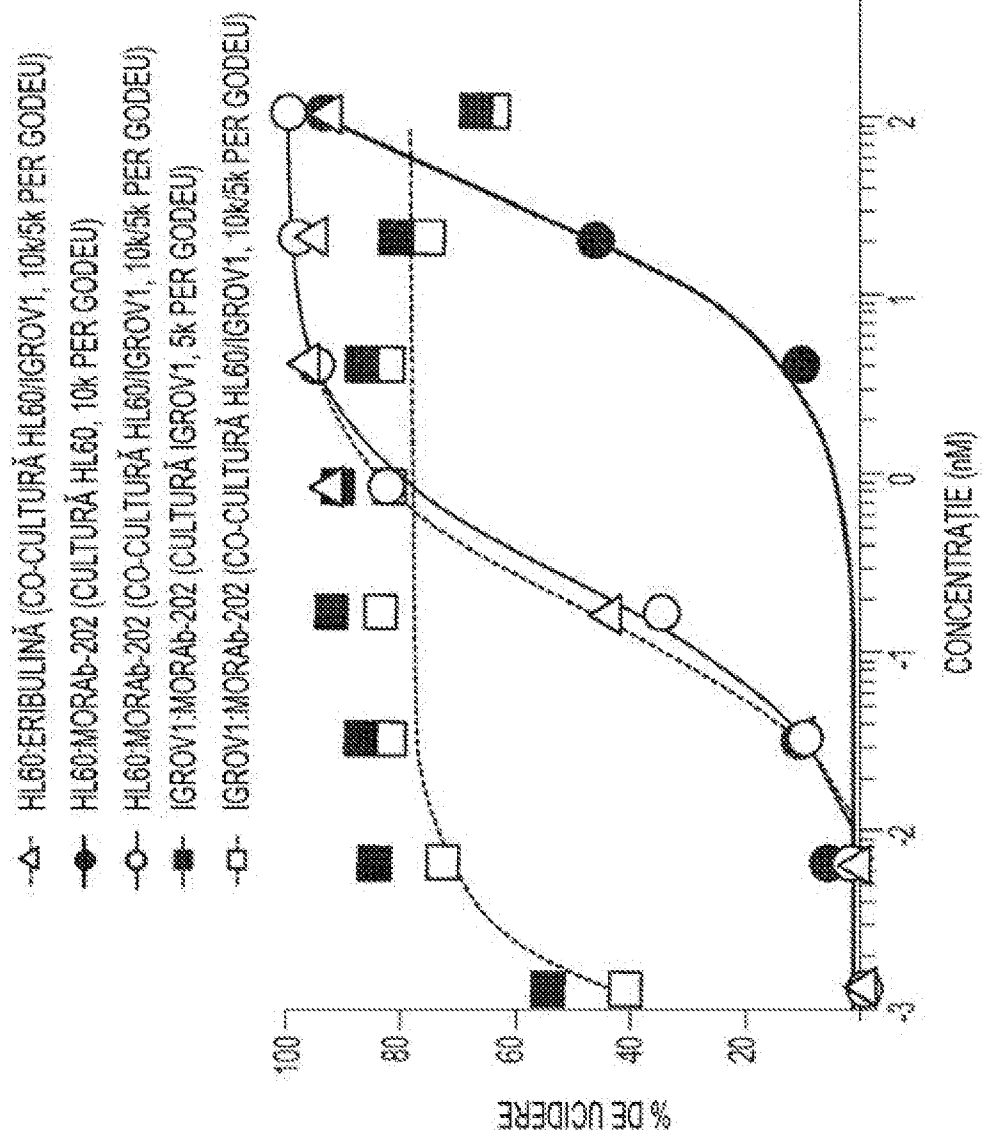


FIG. 4

**FIG. 5**

**FIG. 6A**

- HL60:M3-ER61318 (CULTURĂ HL60, 10k PER GODEU)
- HL60:M3-ER61318 (CO-CULTURĂ HL60/IGROV1, 10k/5k PER GODEU)
- △ HL60:M3-ER61318 (CO-CULTURĂ HL60/IGROV1, 2,5k/5k PER GODEU)
- IGROV1:M3-ER61318 (CO-CULTURĂ IGROV1, 5k PER GODEU)

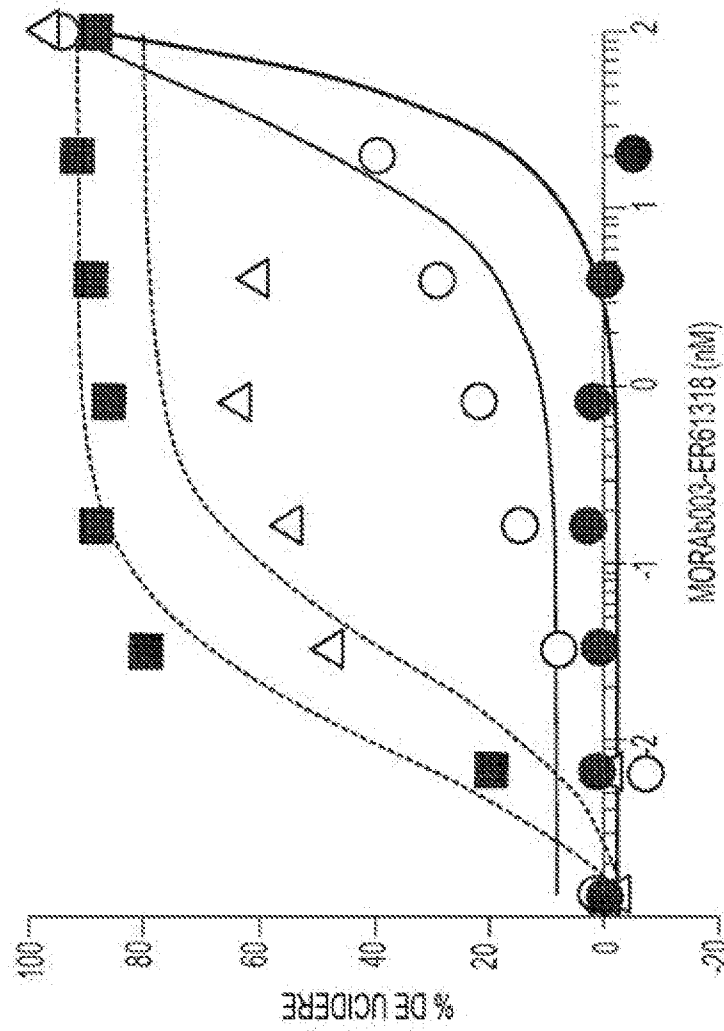


FIG. 6B

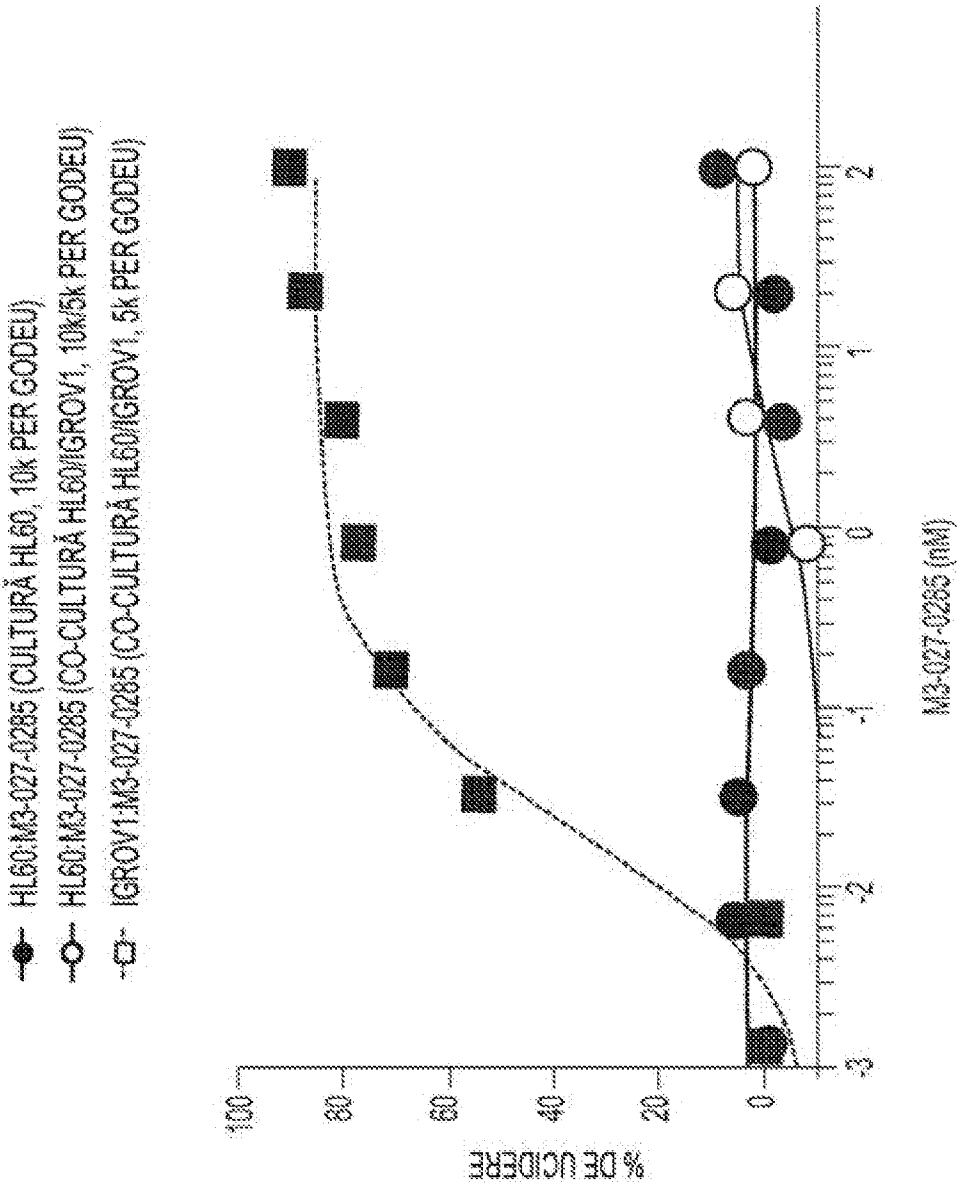
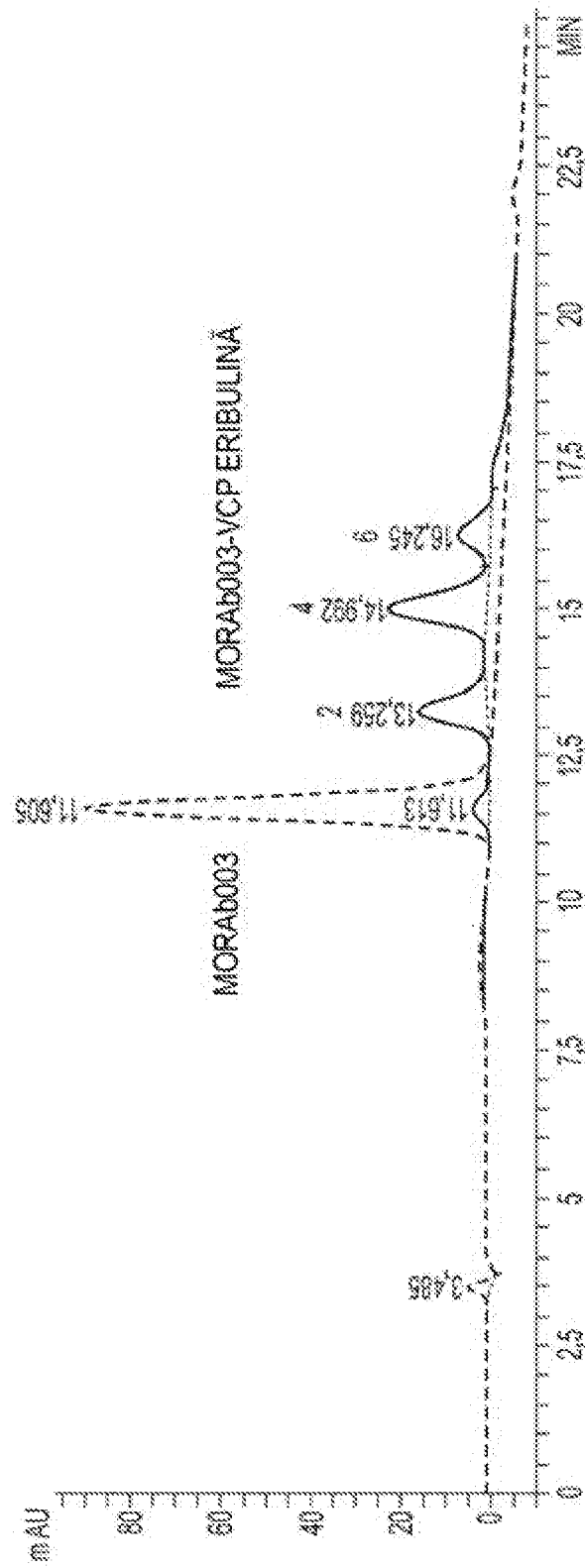
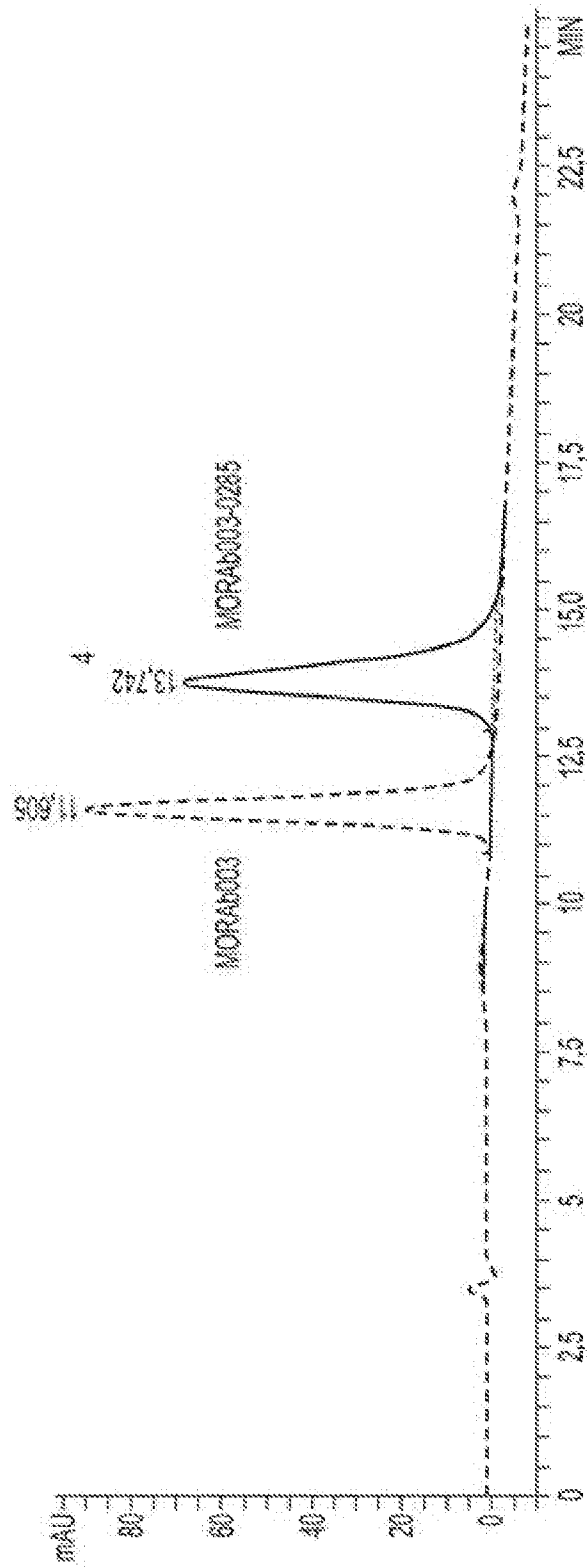


FIG. 6C

**FIG. 7A**

**FIG. 7B**

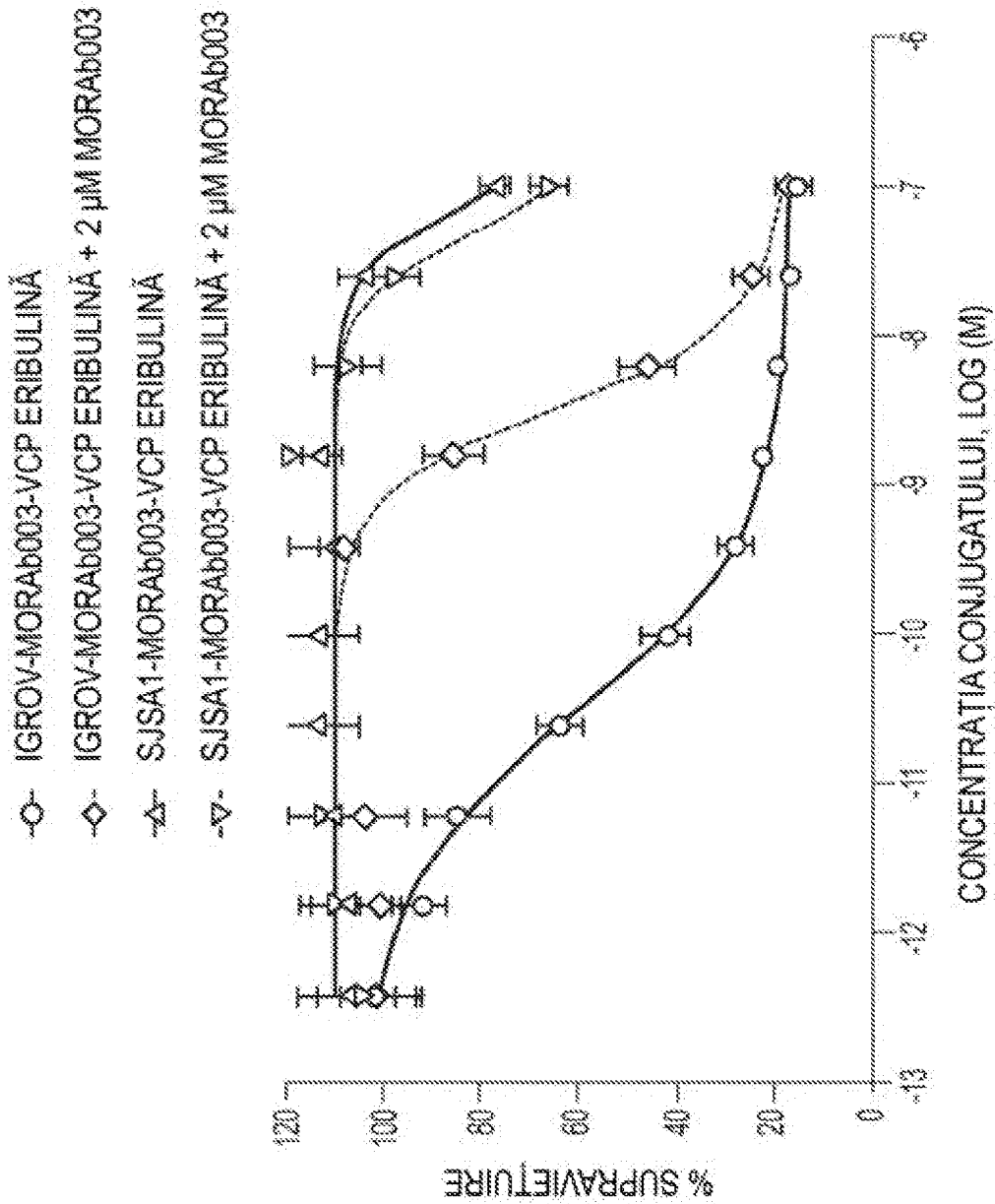
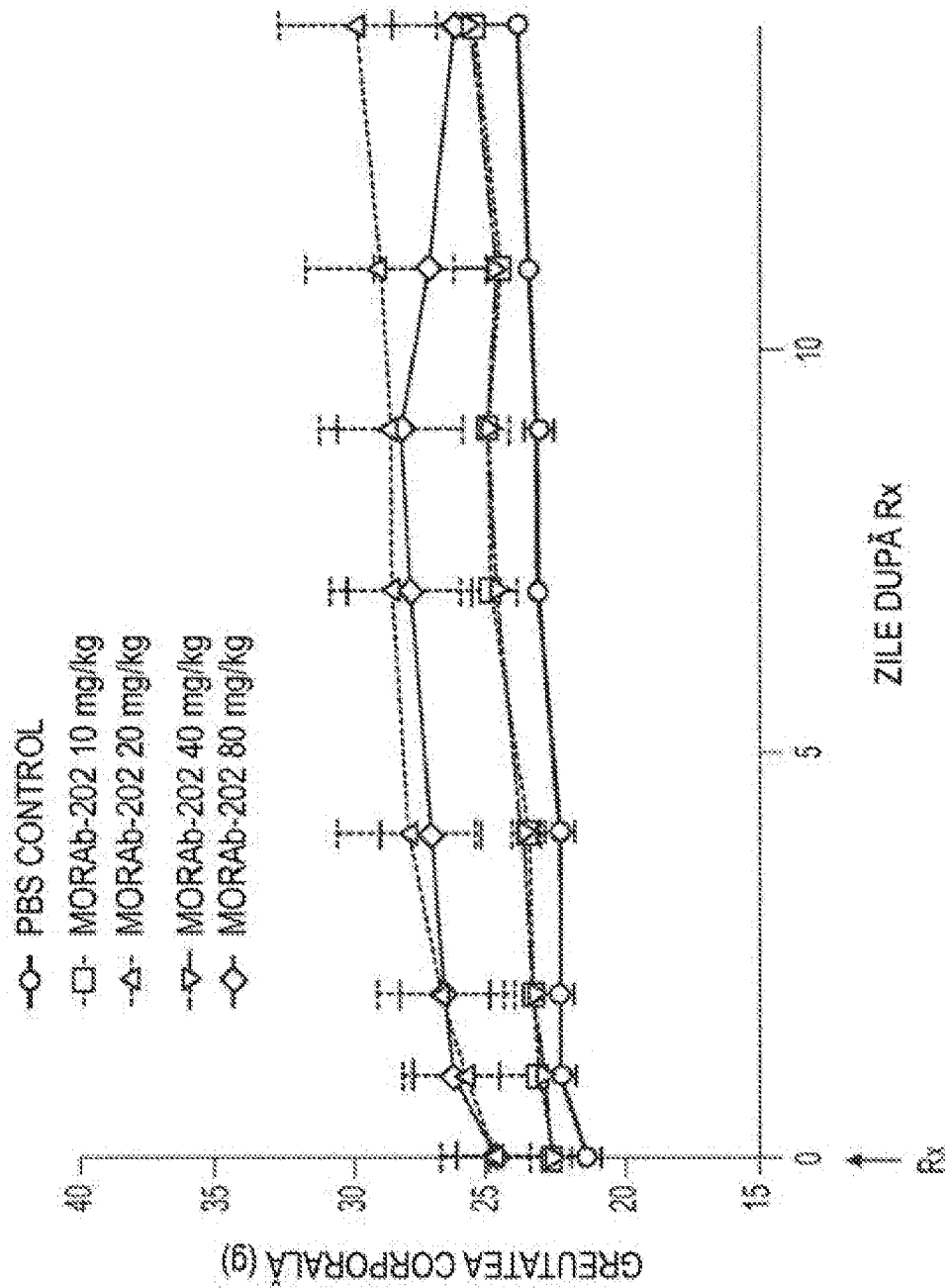


FIG. 8

**FIG. 9**

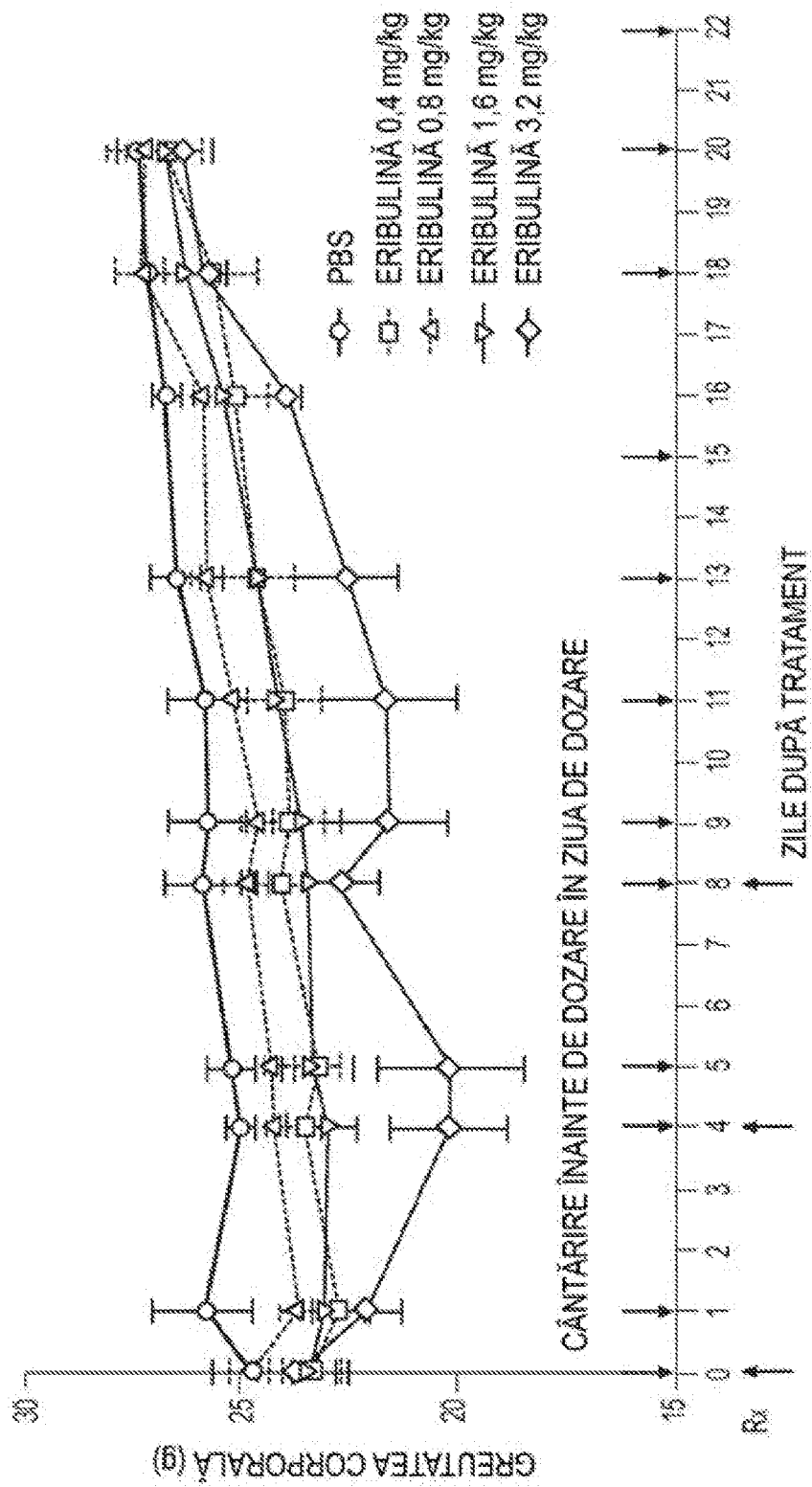
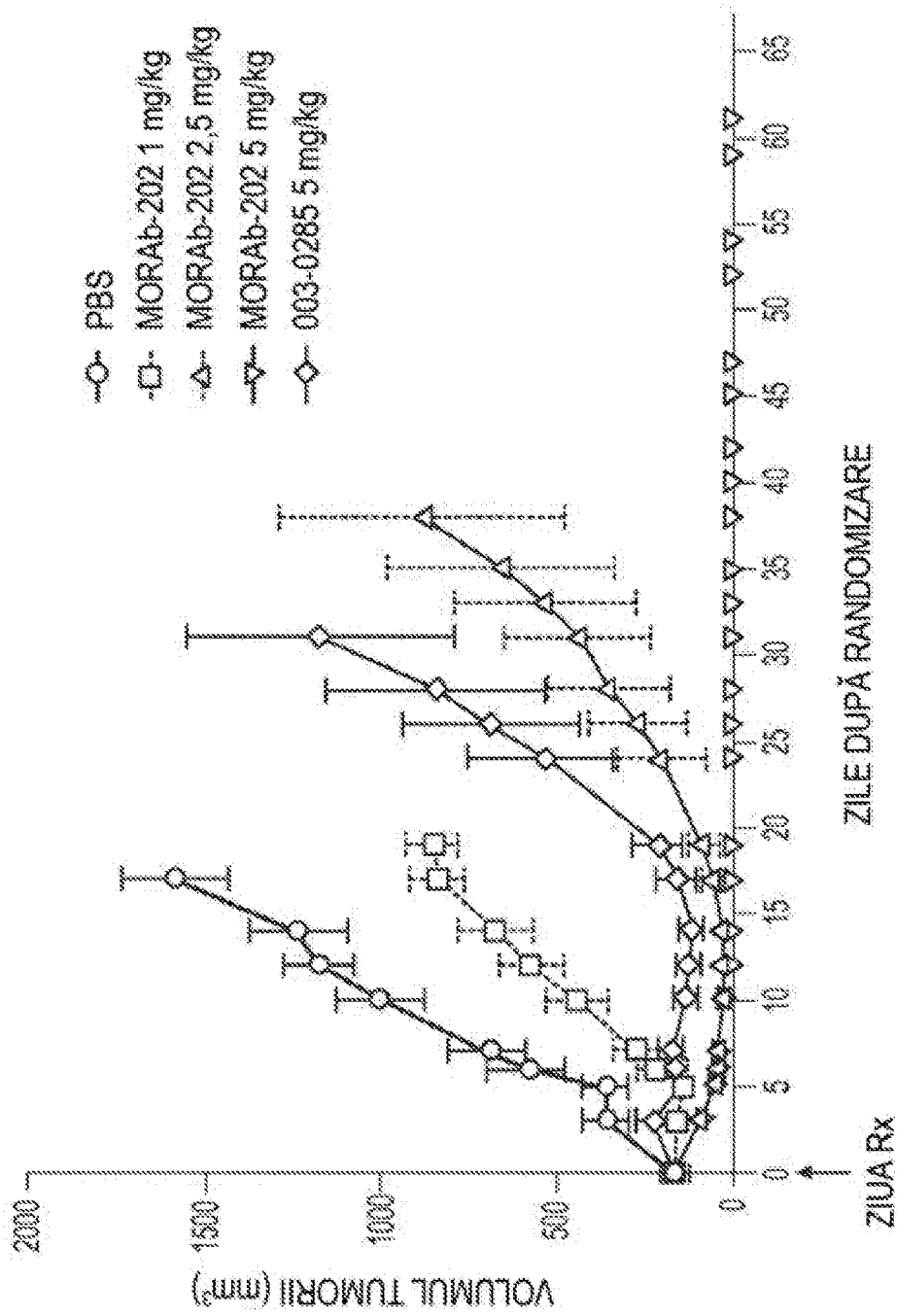


FIG. 10

**FIG. 11**

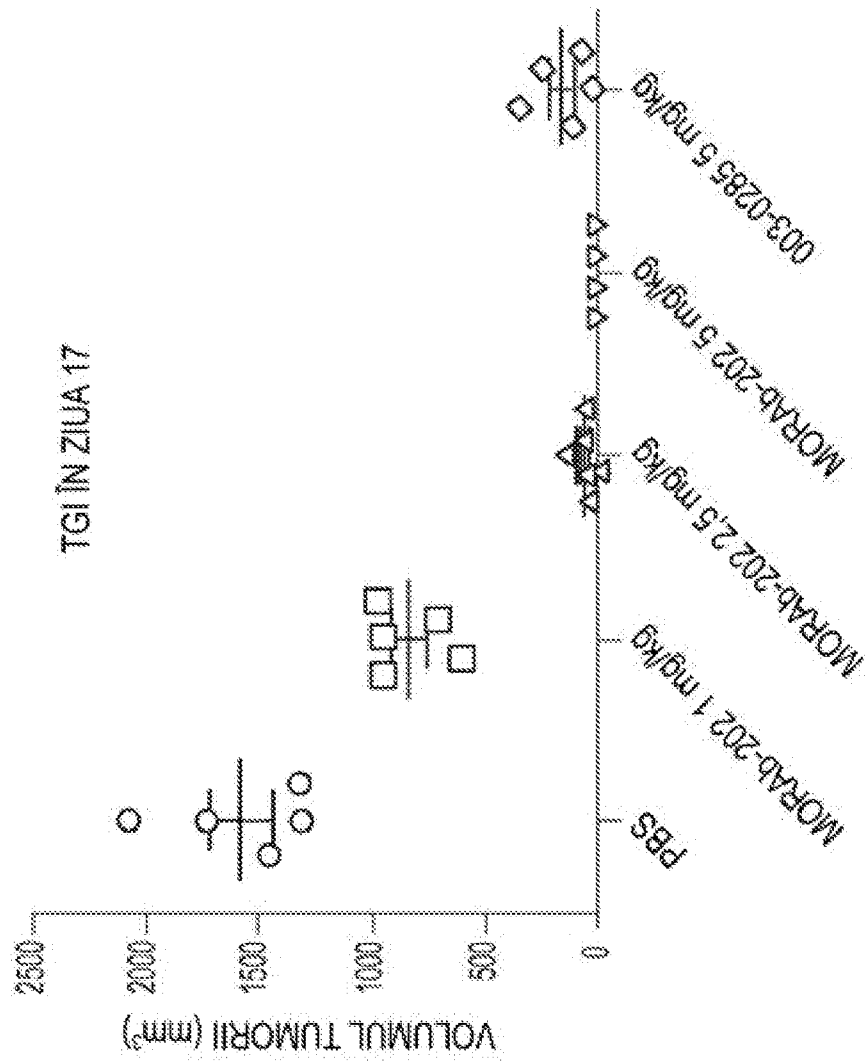
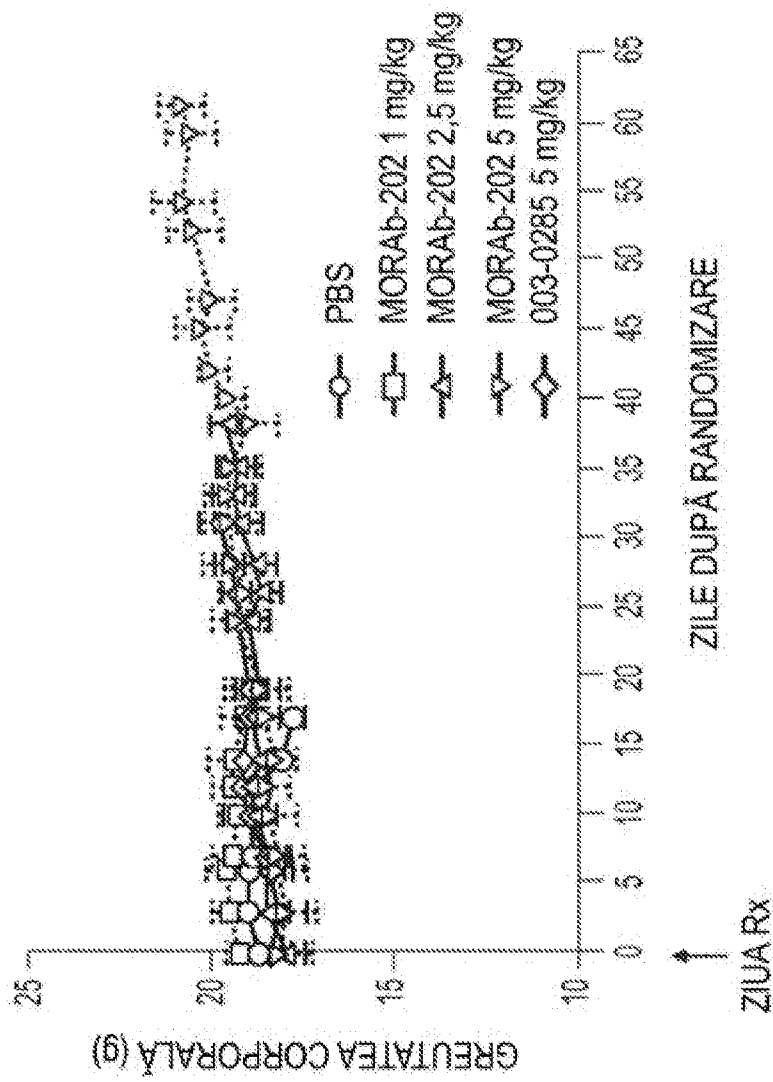


FIG. 12

**FIG. 13**

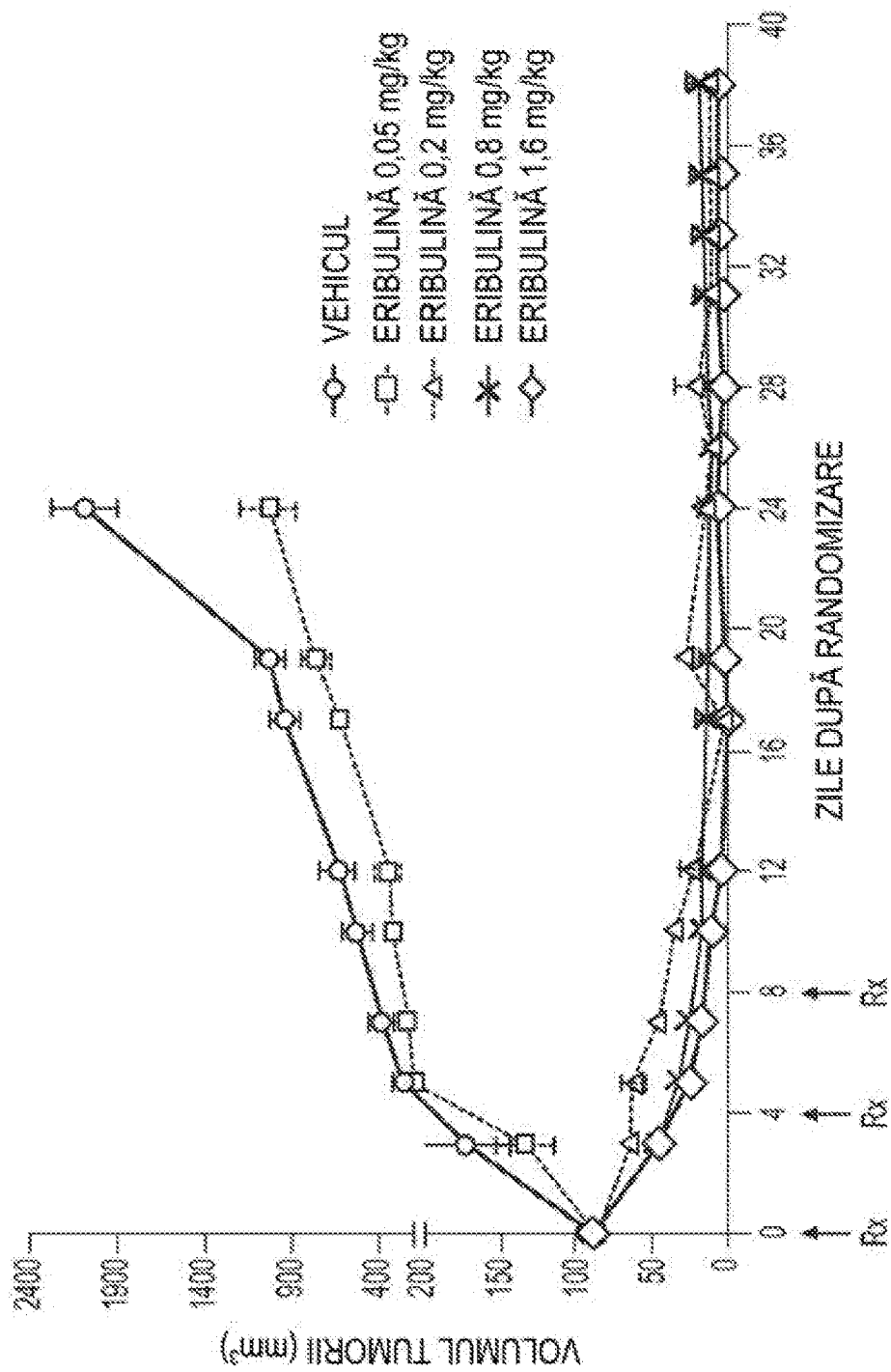
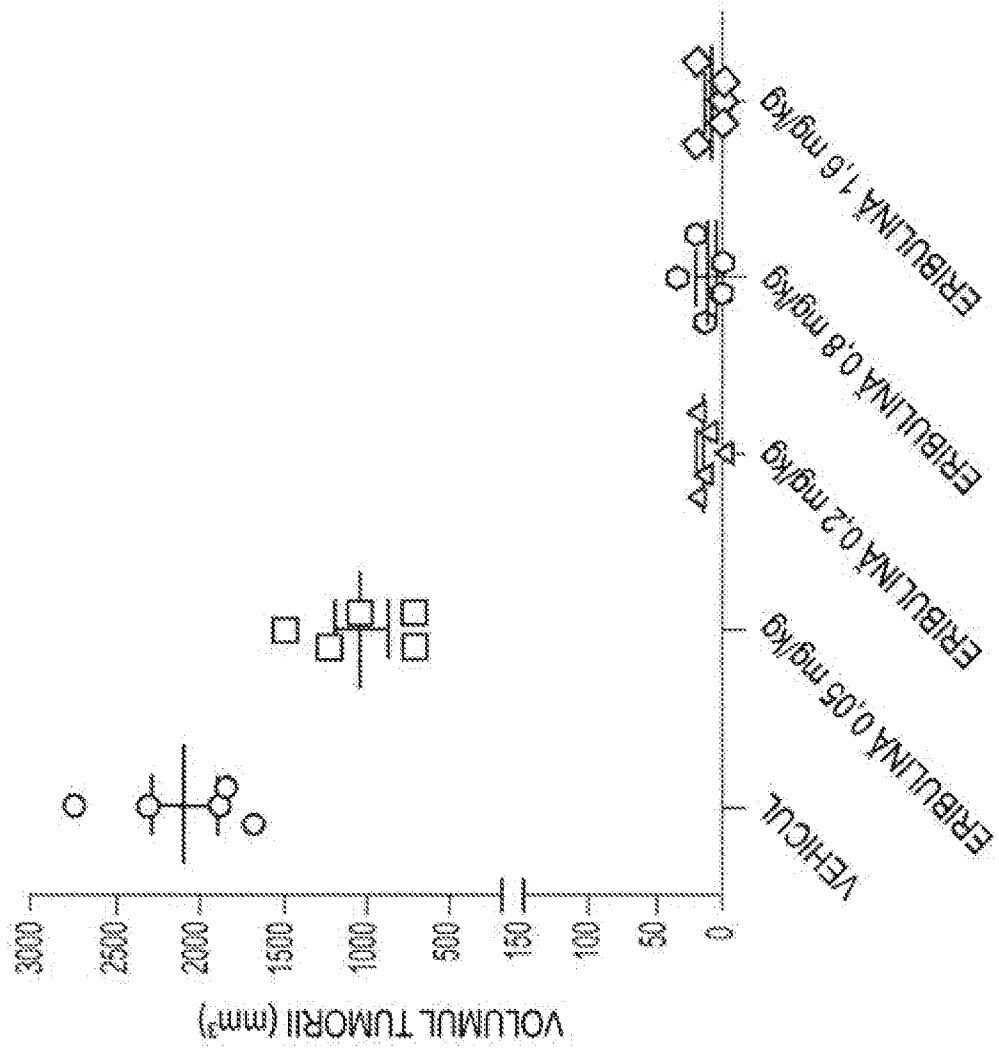
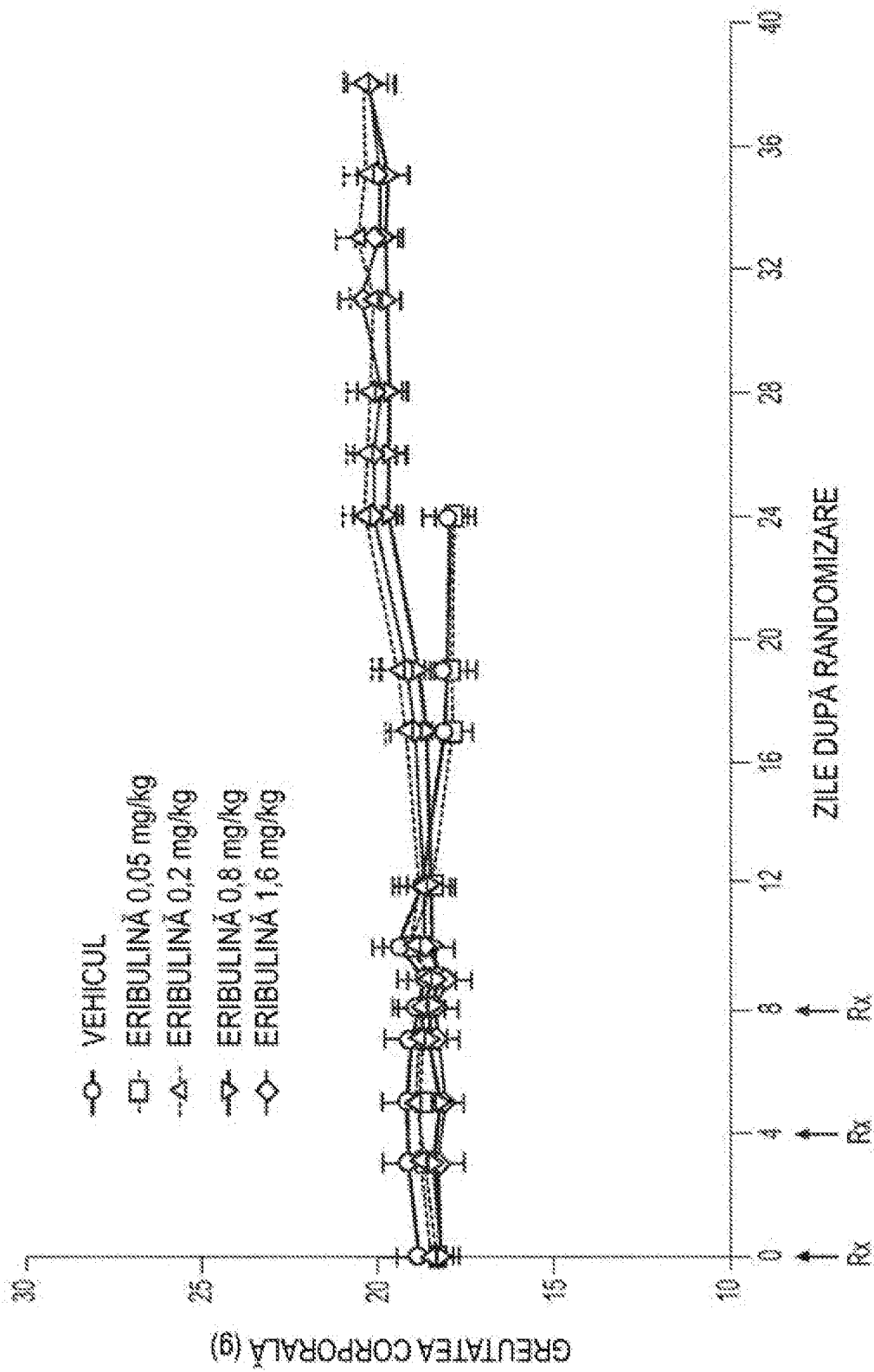
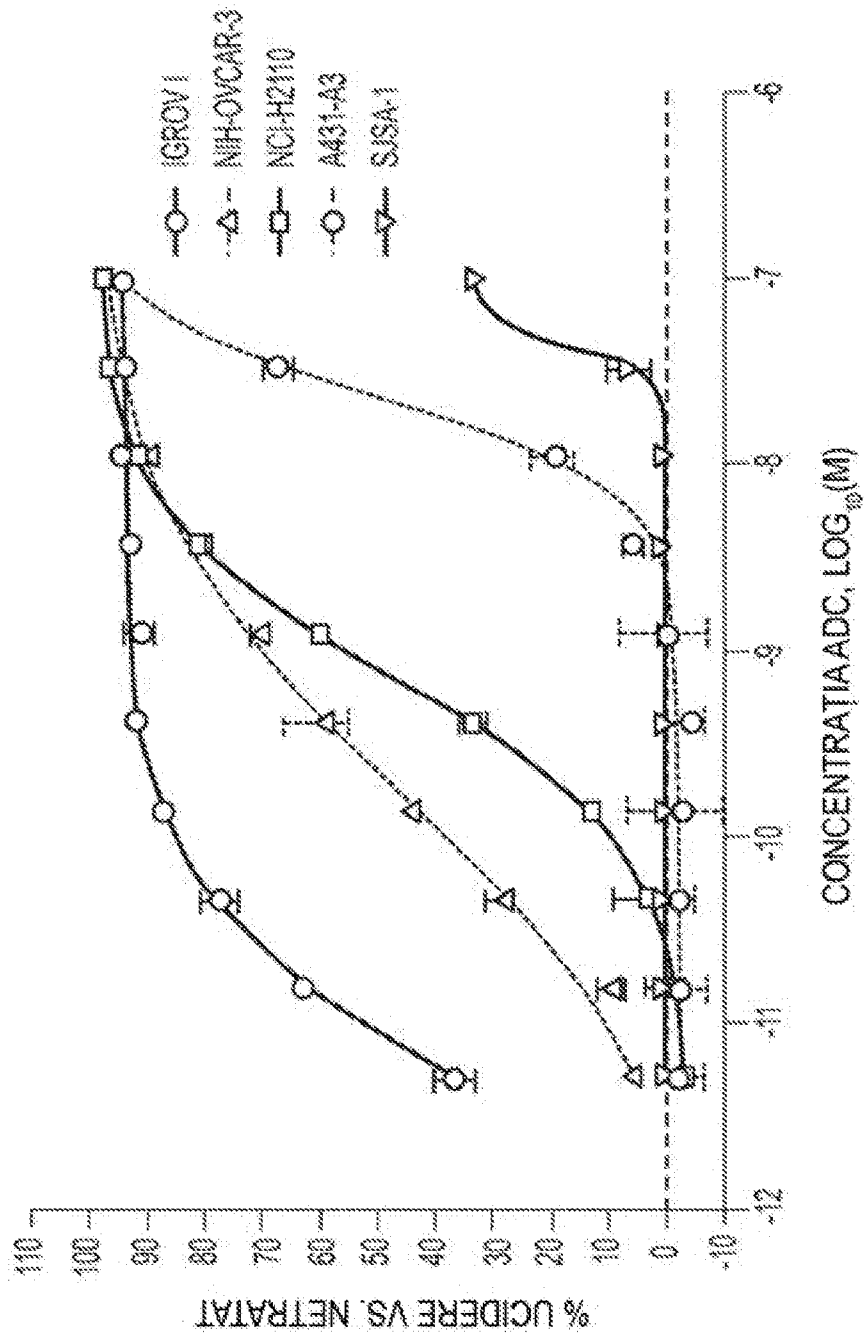


FIG. 14

**FIG. 15**

**FIG. 16**

**FIG. 17**

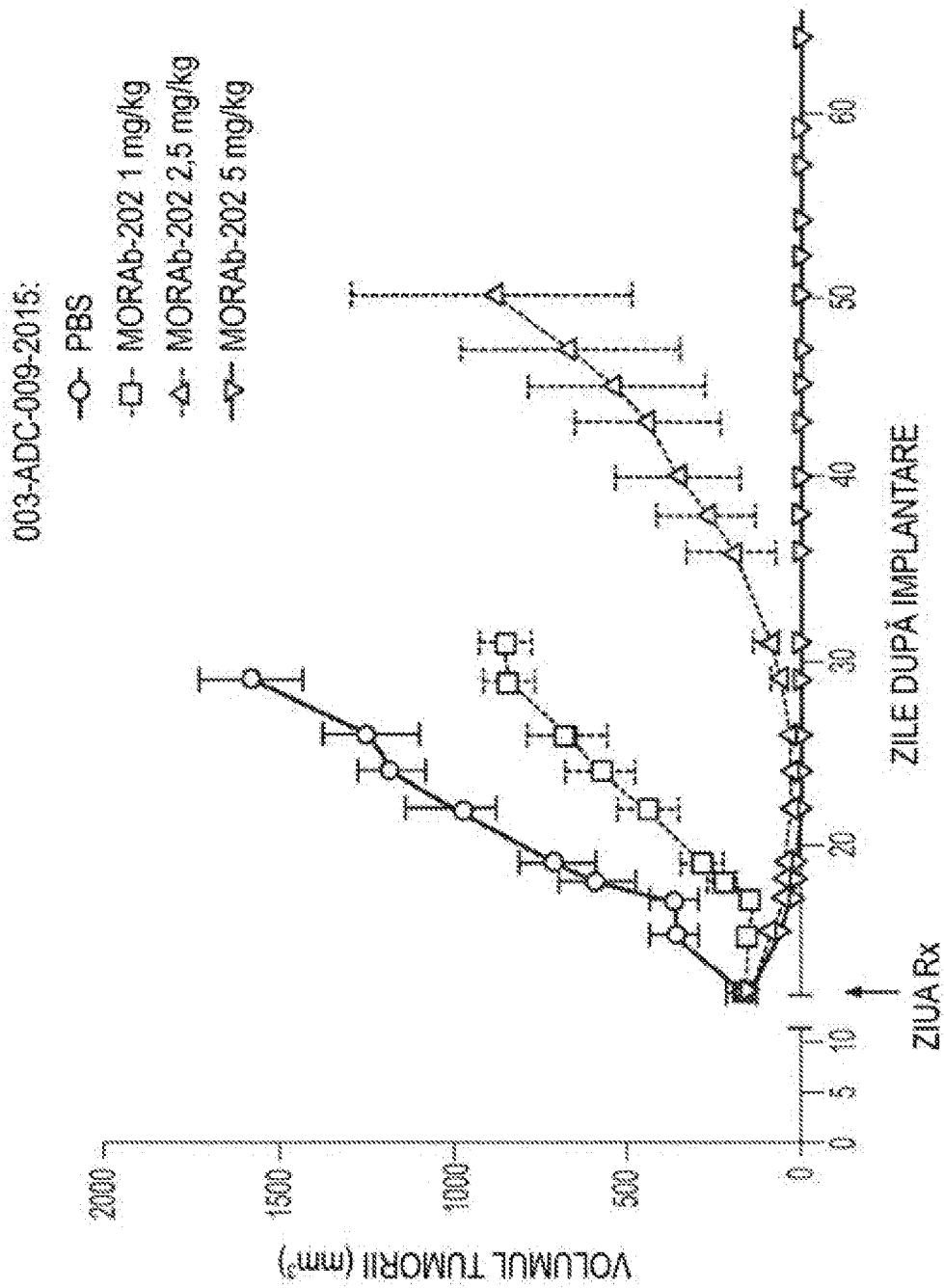
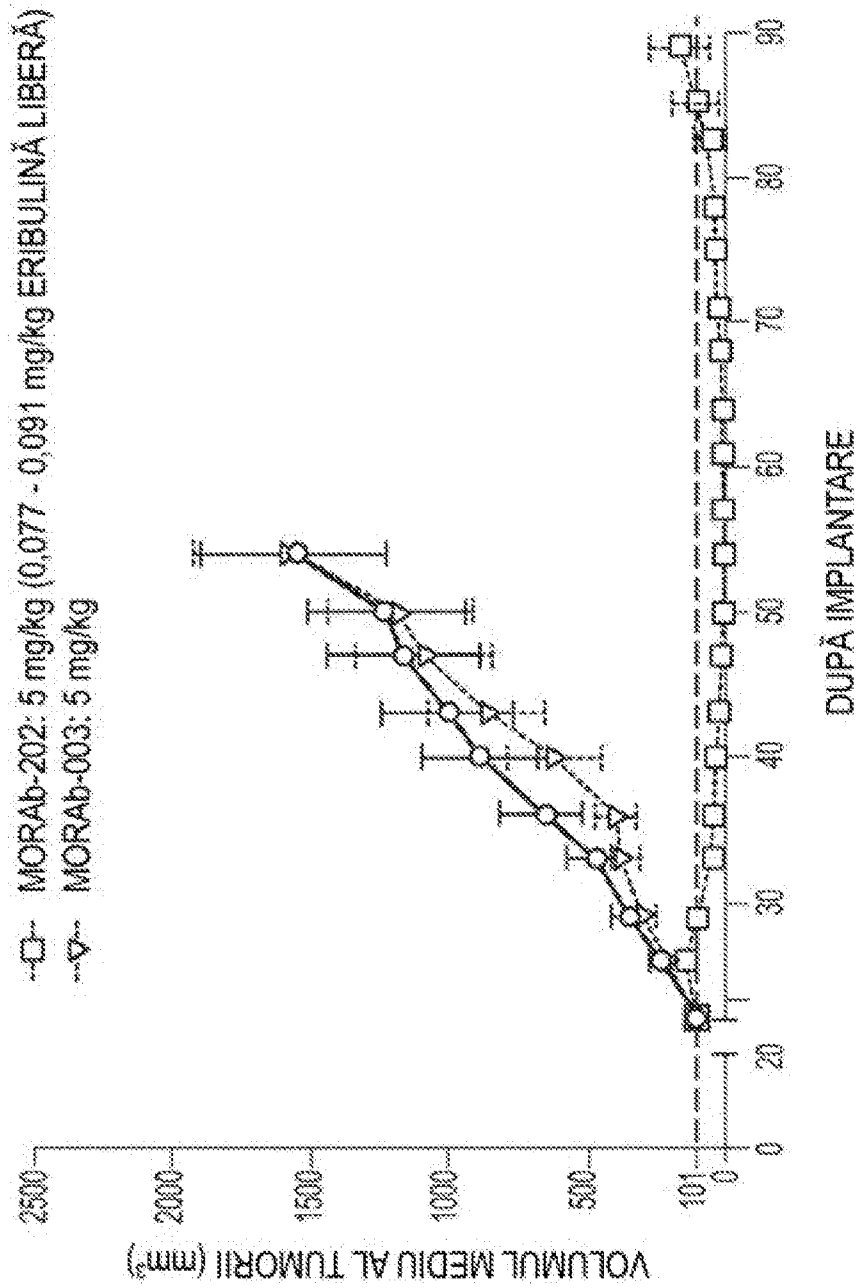
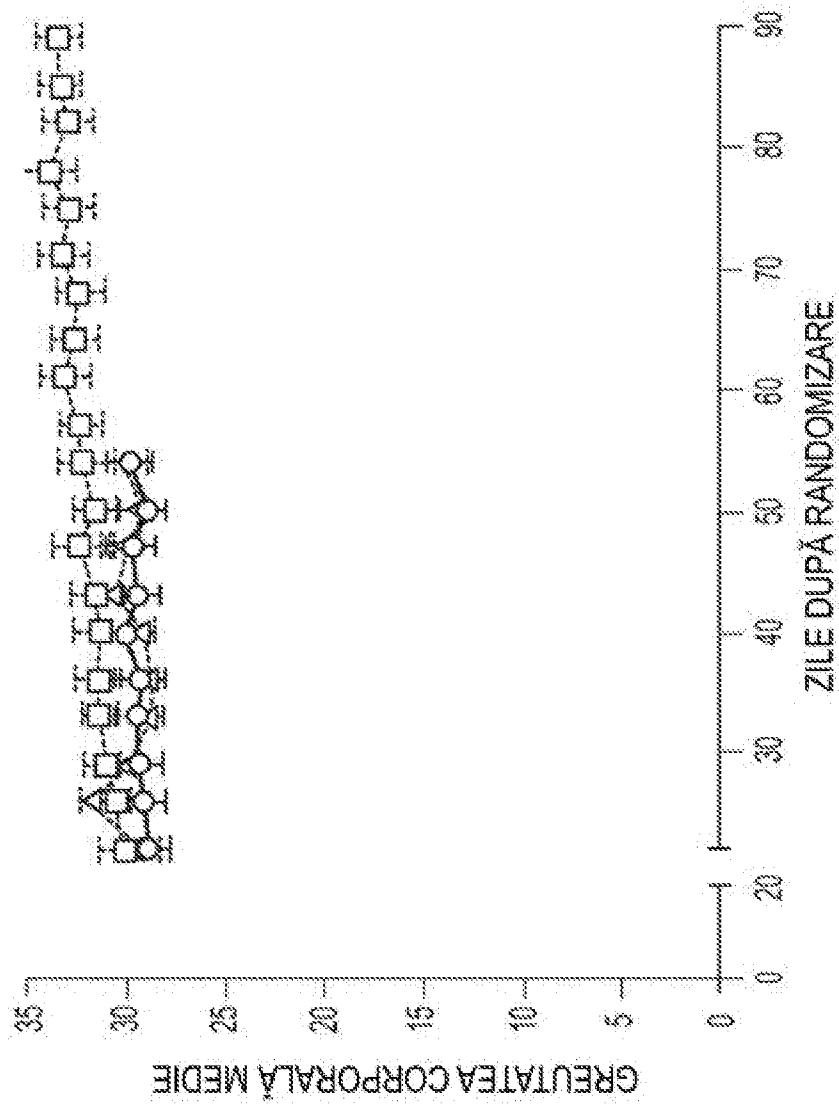


FIG. 18

**FIG. 19A**

**FIG. 19B**

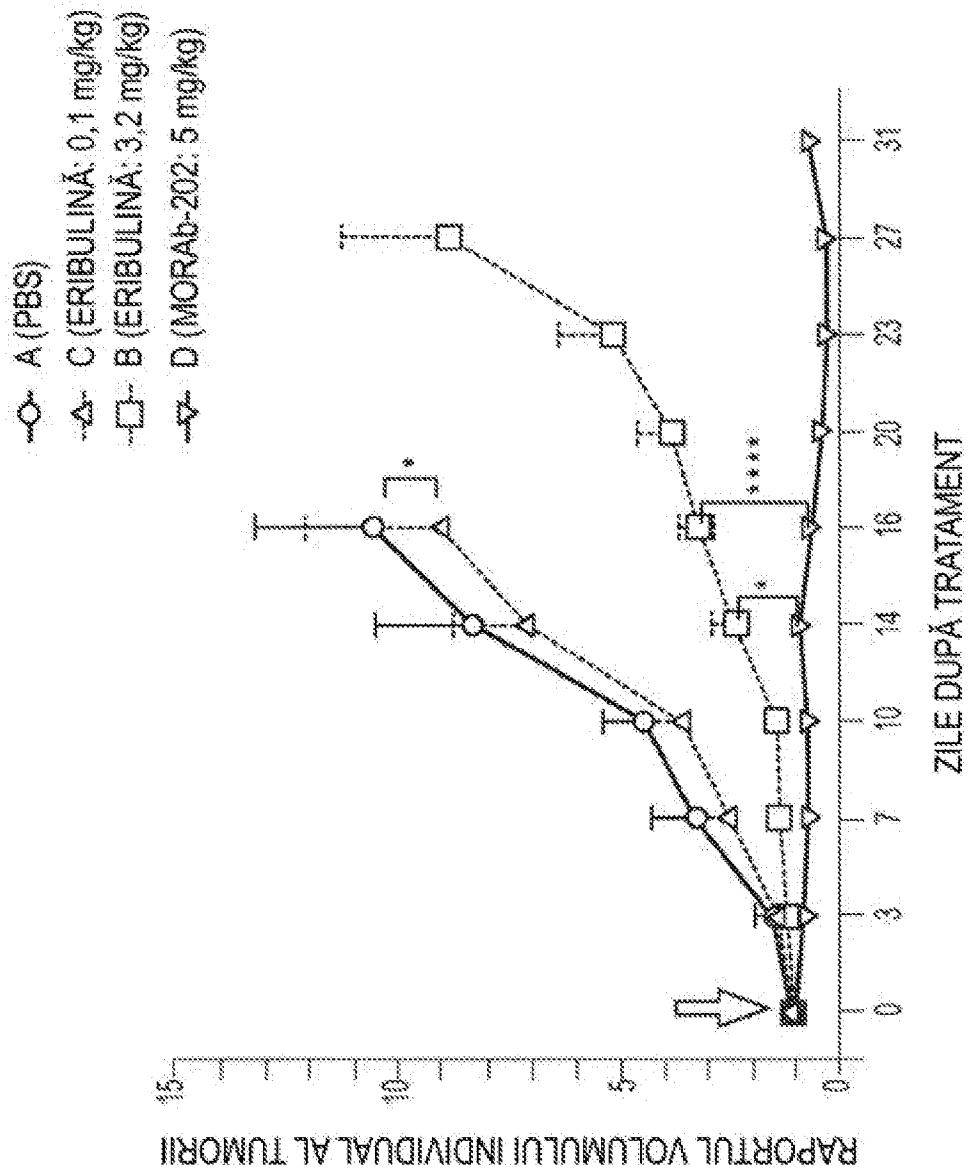
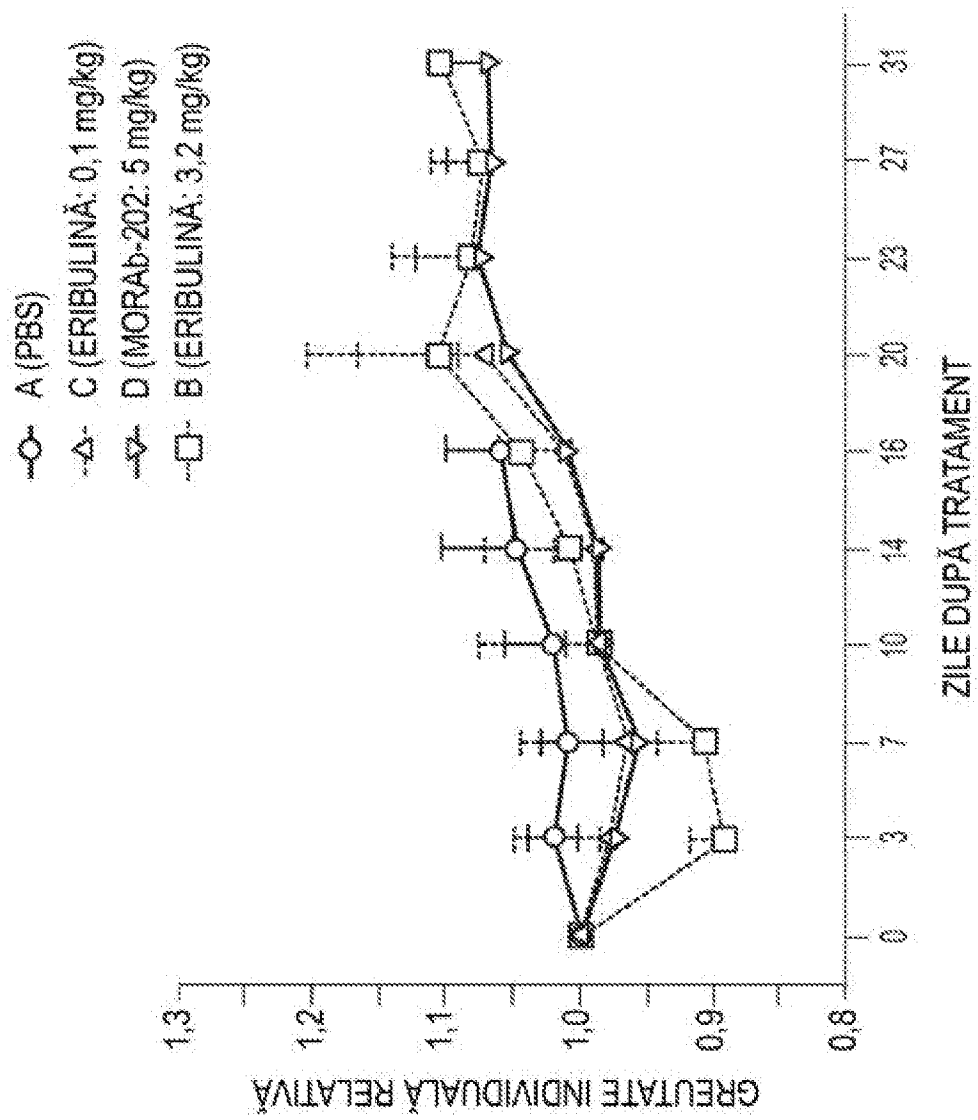
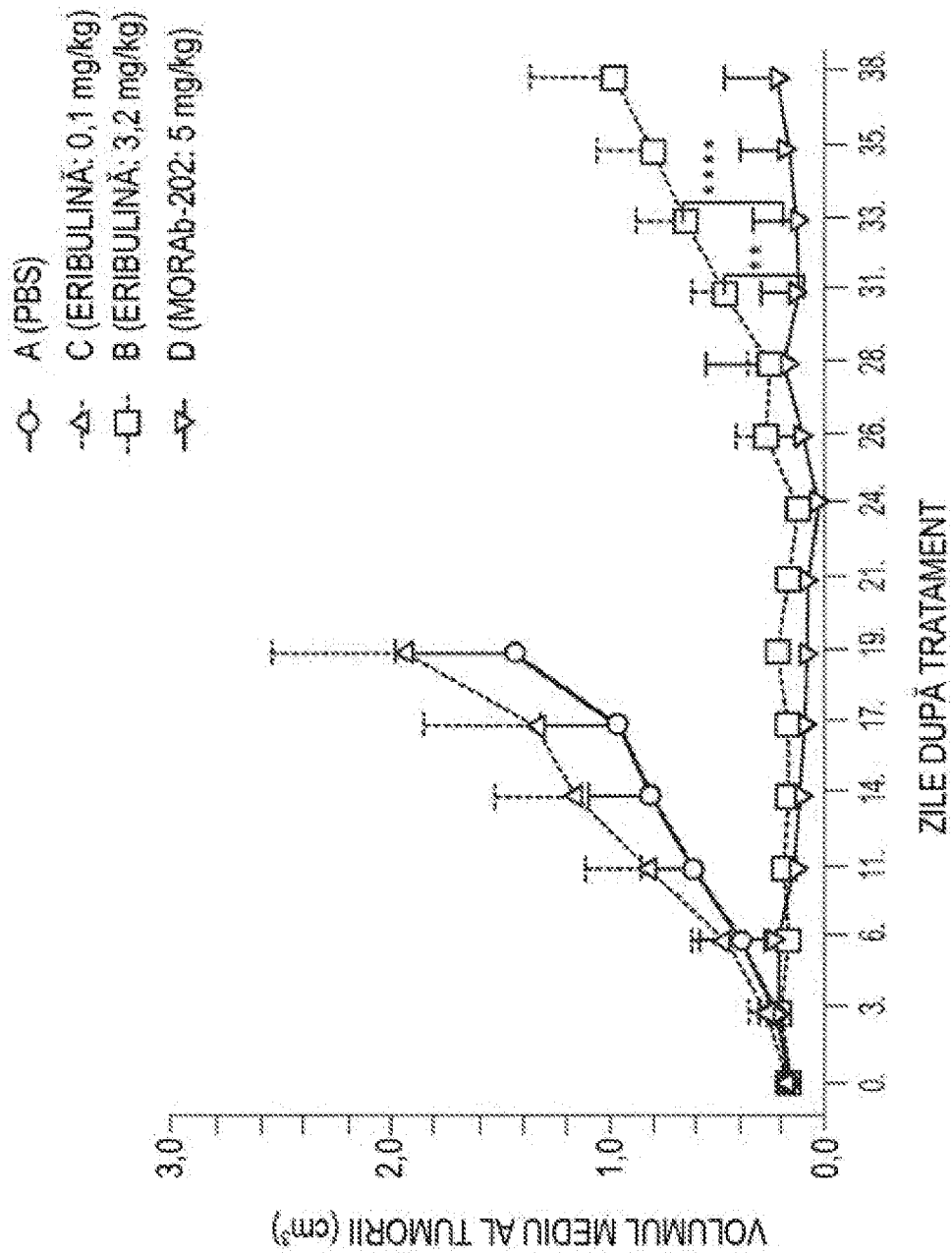
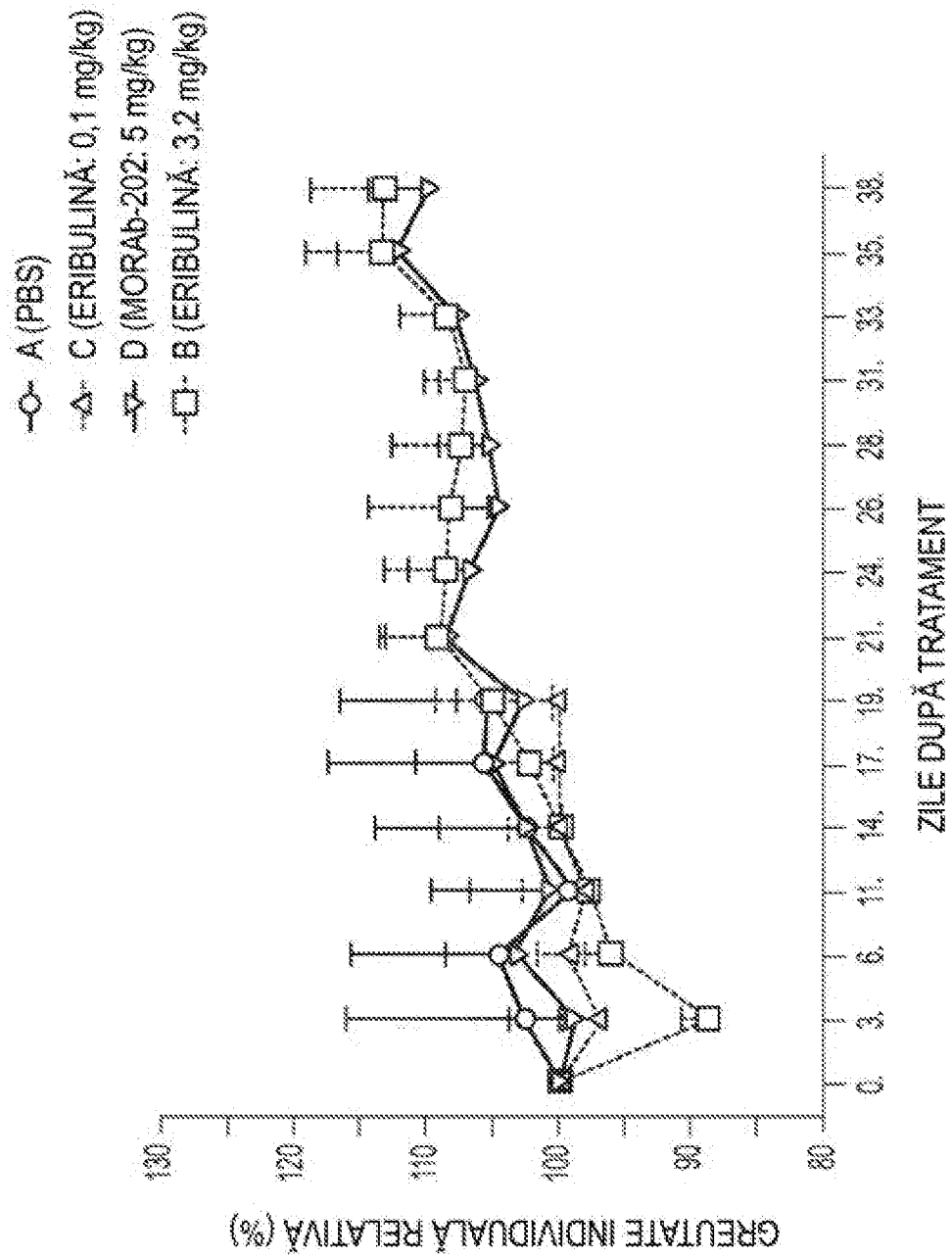


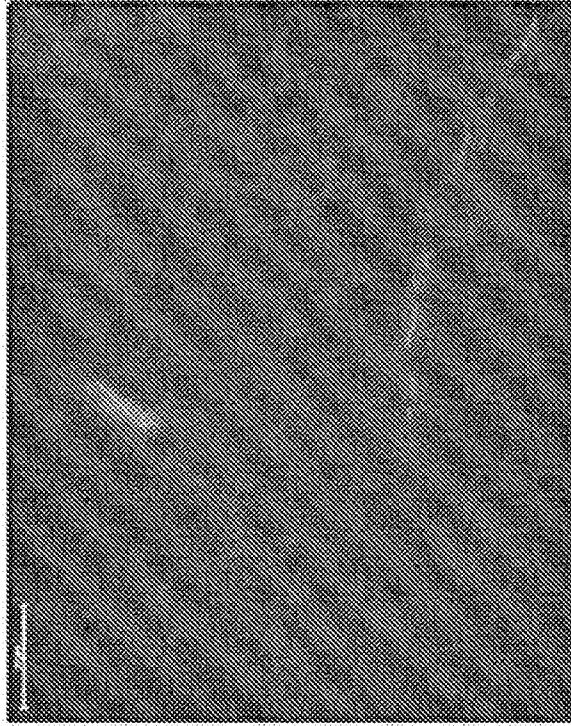
FIG. 20A

**FIG. 20B**

**FIG. 20C**

**FIG. 20D**

VEHICUL



MORAb-202 (5 mg/kg)

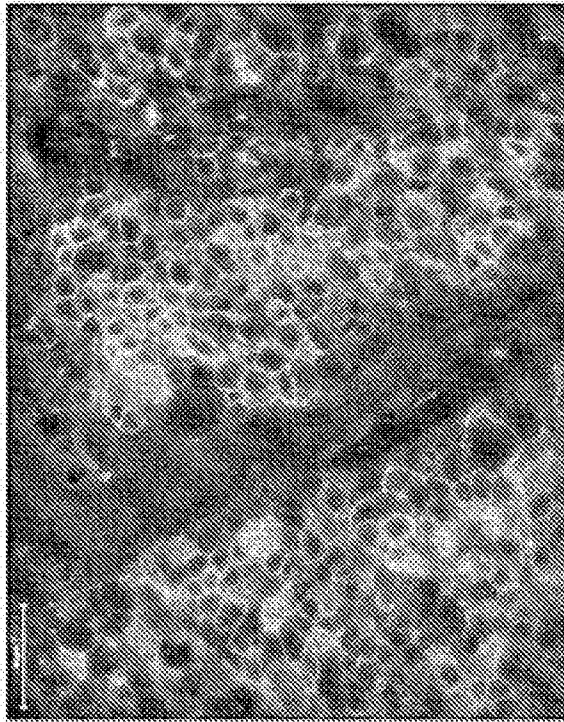
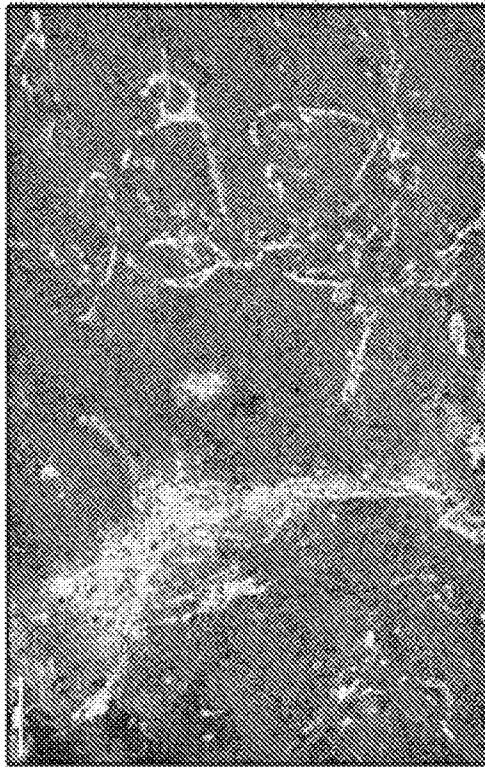


FIG. 21A

NETRATAT



MORAb-202 (5 mg/kg)

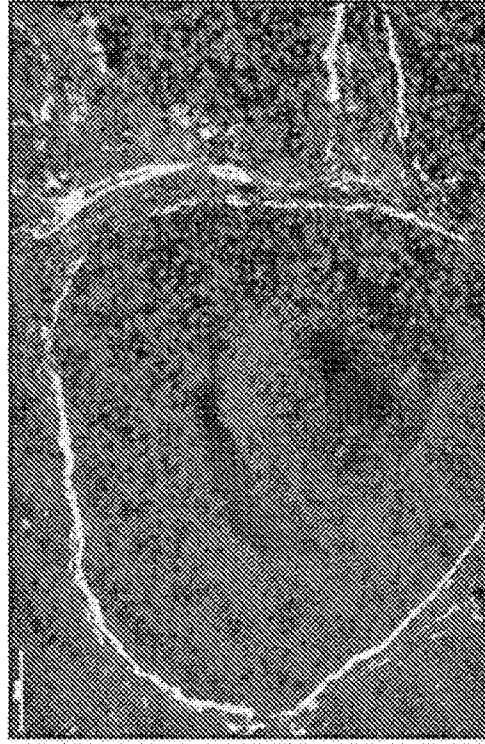
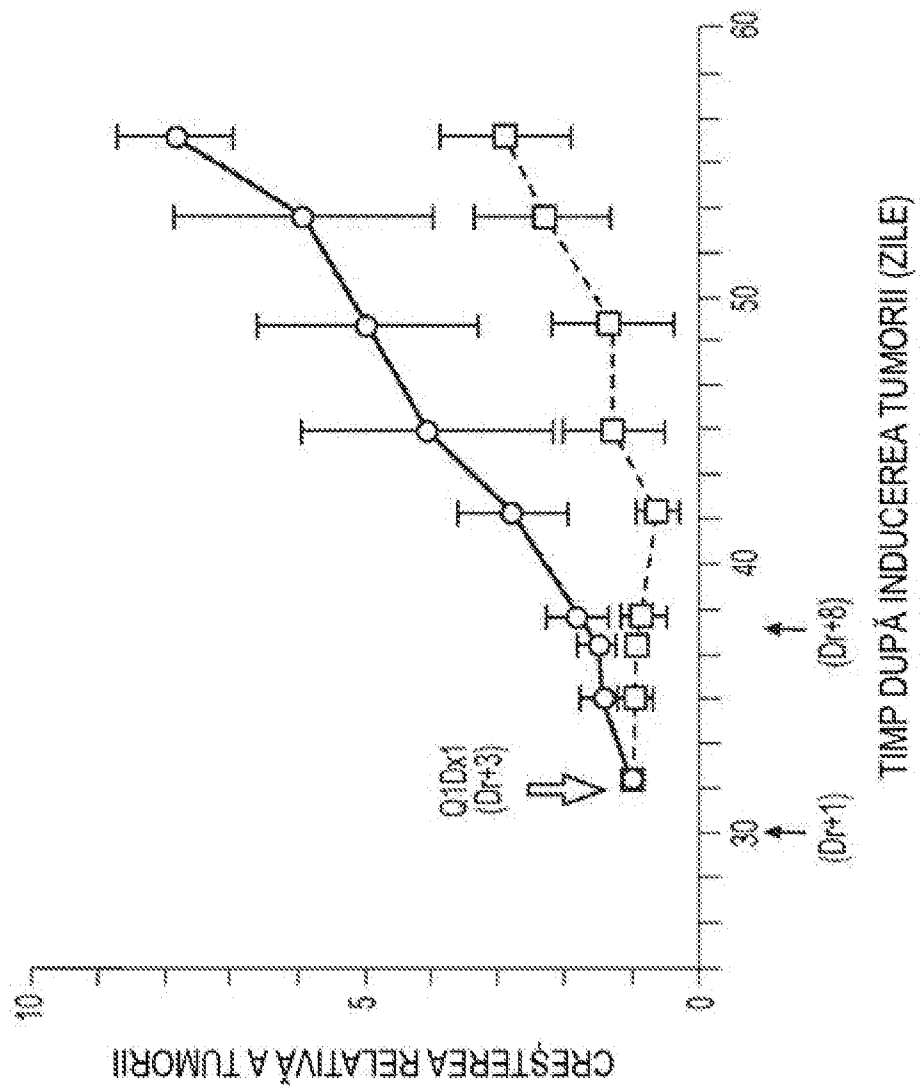


FIG. 21B

**FIG. 21C**

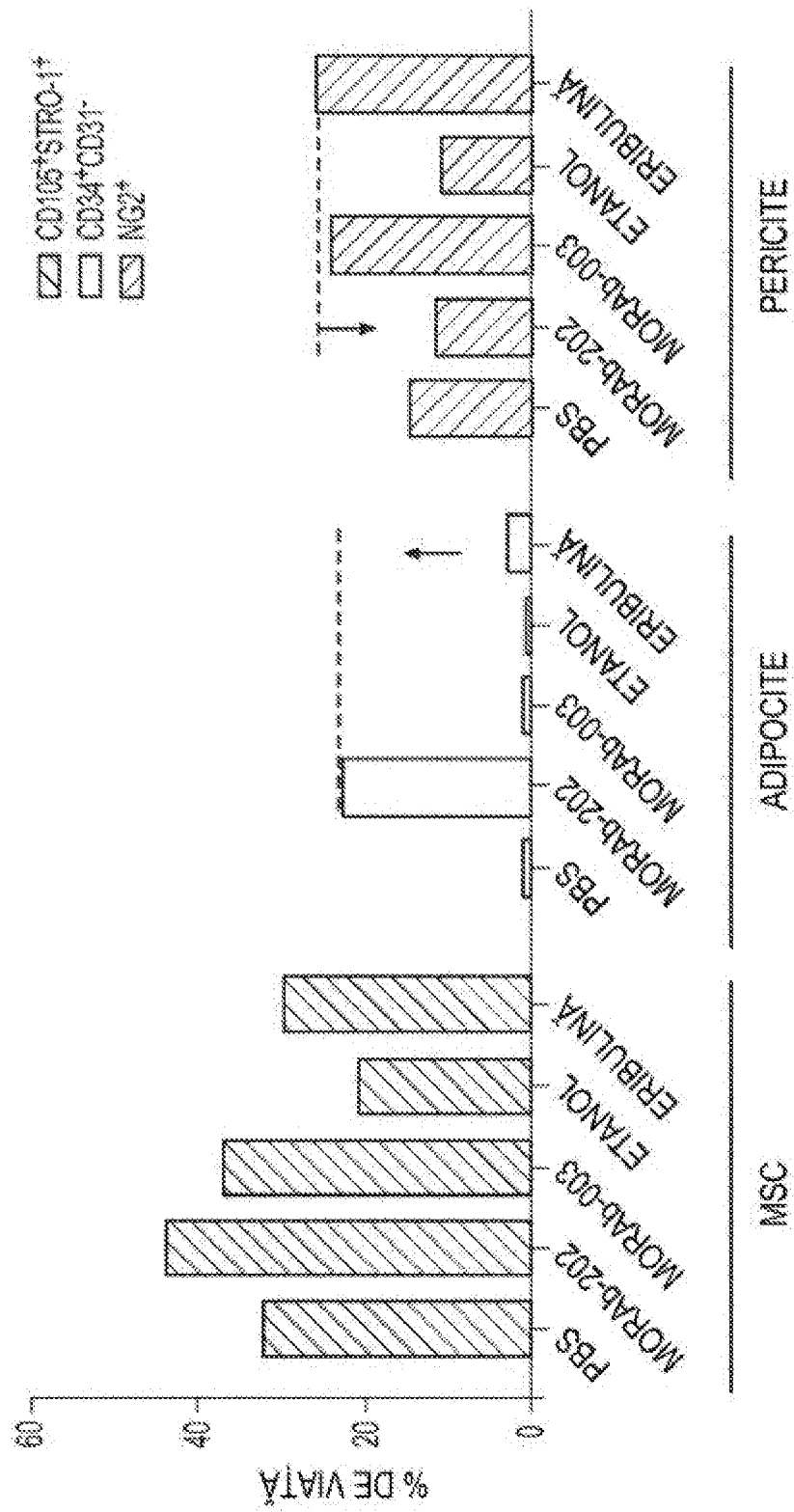
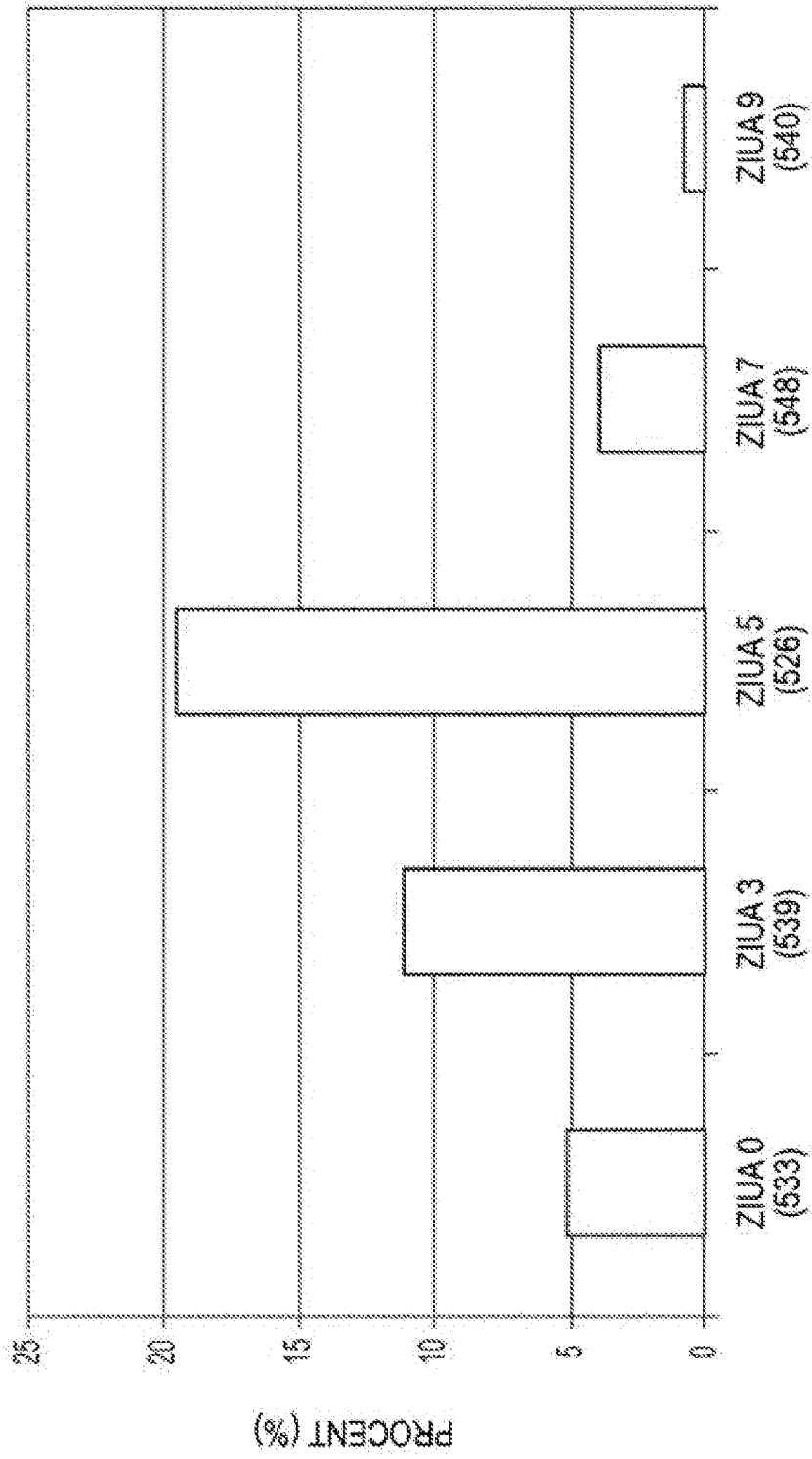


FIG. 22

**FIG. 23**